

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Josipa Martinović

**INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA IONSKIM
GELIRANJEM S OMOTAČIMA PRIRODNOG PORIJEKLA I
BIODOSTUPNOST FENOLNIH SPOJEVA**

DOKTORSKI RAD

Osijek, mjesec, 2026.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 663.26:66.061.3(043.3)

663.26:547.56(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Znanstvena grana: Inženjerstvo

Tema rada: prihvaćena je na V. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. veljače 2022.

Mentor: prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA IONSKIM GELIRANJEM S OMOTAČIMA PRIRODNOG PORIJEKLA I BIODOSTUPNOST FENOLNIH SPOJEVA

Josipa Martinović, 0113131753

Sažetak:

Trop grožđa je proizvodni ostatak vinarija koji obiluje bioaktivnim fenolnim spojevima. Ekstrakti tropa grožđa (cabernet sauvignon, cabernet franc i merlot) dobiveni su kruto-tekućom ekstrakcijom (50 %-tni etanol, omjer tekuće/kruto 40 mL/g, 80 °C). Inkapsulacija ekstrakata provedena je ionskim geliranjem primjenom omotača prirodnog porijekla (natrijev alginat (NA) te njegove kombinacije s gumom arabikom, želatinom (ŽEL) ili kitozanom). Hidrogelovi su stabilizirani sušenjem te su analizirana svojstva inkapsulata (geometrijski parametri, tekstura, morfologija, termofizikalna svojstva; učinkovitost inkapsulacije, otpuštanje fenolnih spojeva tijekom simulirane probave *in vitro*). Uspoređeni su indeksi biodostupnosti (*BI*) fenolnih spojeva iz inkapsulata proizvedenih ionskim geliranjem, sušenjem zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem.

Inkapsulacija ekstrakata je generalno utjecala na povećanje *BI* fenolnih spojeva u odnosu na neinkapsulirane ekstrakte, a najveći utjecaj na *BI* imao je omotač. Kombinacija NA i dodatnog omotača u većini slučajeva rezultirala je boljim fizikalnim i funkcionalnim svojstvima inkapsulata u odnosu na NA inkapsulate. Otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsulata odvijalo se difuzijom, a njihov najveći *BI* u većini slučajeva je ostvaren iz NA-ŽEL inkapsulata. Ionskim geliranjem je postignut najveći *BI* kod ukupnih fenolnih spojeva, proantocijanidina, katehina, epikatehina, epikatehin galata, galokatehin galata te galne, 3,4-dihidroksibenzojeve i *o*-kumarinske kiseline. Odabirom metode inkapsulacije i omotača moguće je osigurati zaštitu i ciljano otpuštanje bioaktivnih spojeva tropa grožđa.

Ključne riječi: trop grožđa, fenolni spojevi, inkapsulacija, ionsko geliranje, biodostupnost

Rad sadrži: 317 stranica
63 slika
59 tablica
3 priloga
393 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu:

1.	titula Ime i prezime	predsjednik
2.	titula Ime i prezime	član
3.	titula Ime i prezime	član
4.	titula Ime i prezime	zamjena člana

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Doctoral Study Food Technology and Nutrition

Department of Process Engineering
Subdepartment of Mechanical, Thermal and Separation Processes
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

UDC: 663.26:66.061.3(043.3); 663.26:547.56(043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. V held on 28 February 2022.

Mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, full professor

ENCAPSULATION OF GRAPE POMACE EXTRACTS BY IONIC GELATION WITH NATURAL COATINGS AND BIOACCESSIBILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS

Josipa Martinović, 0113131753

Summary:

Grape pomace is a winery by-product rich in bioactive phenolic compounds. Grape pomace (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, and Merlot) extracts were obtained by solid–liquid extraction (50% ethanol, liquid-to-solid ratio 40 mL/g, 80 °C). The extracts were encapsulated by ionic gelation using natural-origin coatings: sodium alginate (SA) and its combinations with Arabic gum, gelatin (GEL), or chitosan. The hydrogels were stabilised by drying, and the resulting beads were analysed for geometric parameters, texture, morphology, thermophysical properties, encapsulation efficiency, and the release of phenolic compounds during *in vitro* simulated digestion. The bioaccessibility index (*BI*) of phenolic compounds from encapsulated particles produced by ionic gelation, freeze-drying, and spray-drying was compared. Encapsulation generally increased the *BI* of phenolic compounds compared with non-encapsulated extracts, with the coating type having the greatest influence. Combining SA with an additional coating usually improved the physical and functional properties of the encapsulated particles compared with those prepared using SA alone. The release of phenolic compounds from the encapsulated particles occurred *via* diffusion, with the highest *BI* in most cases observed for SA–GEL particles. Ionic gelation yielded the highest *BI* for total phenolic compounds, total proanthocyanidins, catechin, epicatechin, epicatechin gallate, gallic acid, and gallic, 3,4-dihydroxybenzoic, and *o*-coumaric acids. By selecting the encapsulation method and coating, protection and targeted release of bioactive compounds from grape pomace can be achieved.

Key words: grape pomace, phenolic compounds, encapsulation, ionic gelation, bioaccessibility

Thesis contains:
317 pages
63 figures
59 tables
3 supplements
393 references

Original in: Croatian

Review (Evaluation) committee:

1.	Name and surname, PhD, prof./associate prof./assistant prof.	chair person
2.	Name and surname, PhD, prof./associate prof./assistant prof.	member
3.	Name and surname, PhD, prof./associate prof./assistant prof.	member
4.	Name and surname, PhD, prof./associate prof./assistant prof.	stand-in

Defense date: date

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek

DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

Pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:

1.

titula, Ime Prezime

predsjednik

(potpis)
2.

titula, Ime Prezime

član

(potpis)
3.

titula, Ime Prezime

član

(potpis)

ZA OCENU

Zahvala...



HRZZ
Hrvatska zaklada
za znanost



PTF

Ovaj doktorski rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost “Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije” (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227) i bilateralnog projekta Hrvatska-Mađarska „Inkapsulacija ekstrakata bogatih polifenolima iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije i karakterizacija enkapsuliranih čestica“ (HRHUN-2020-011)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. Teorijski dio	4
2.1. TRENDOWI U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI – ODRŽIVO I KRUŽNO BIOGOSPODARENJE	5
2.2. TROP GROŽĐA.....	8
2.3. FENOLNI SPOJEVI TROPA GROŽĐA	9
2.3.1. Fenolne kiseline	10
2.3.2. Stilbeni	11
2.3.3. Lignani	12
2.3.4. Flavonoidi	13
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH TVARI IZ TROPA GROŽĐA	15
2.5. BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA	17
2.5.1. Faktori koji utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva	18
2.5.2. Probava fenolnih spojeva u gastrointestinalnom sustavu	19
2.5.3. <i>In vitro</i> statički model ispitivanja biodostupnosti fenolnih spojeva	21
2.6. INKAPSULACIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	23
2.6.1. Omotači.....	24
2.6.1.1. Polisaharidi	25
2.6.1.2. Lipidi, masti i ulja, voskovi	31
2.6.1.3. Proteini.....	32
2.6.2. Metode inkapsulacije.....	33
2.6.2.1. Sušenje raspršivanjem.....	33
2.6.2.2. Sušenje zamrzavanjem.....	35
2.6.2.3. Ionsko geliranje.....	36
2.7. MATEMATIČKO MODELIRANJE KINETIKE OTPUŠTANJA AKTIVNE TVARI IZ INKASPULATA	40
2.7.1. Fickov zakon difuzije	42
2.7.2. Model prvog reda	43
2.7.3. Higuchi model.....	44
2.7.4. Hixson-Crowell model	47
2.7.5. Korsmeyer-Peppas model	49
3. EKSPERIMENTALNI DIO	51
3.1. ZADATAK	52
3.2. MATERIJALI.....	54
3.2.1. Uzorci tropa grožđa.....	54
3.2.2. Kemikalije	54
3.2.3. Uređaji.....	55
3.3. METODE.....	56
3.3.1. Analiza kemijskog sastava tropa grožđa	56
3.3.1.1. Određivanje udjela suhe tvari	57
3.3.1.2. Određivanje udjela slobodnih masti.....	57
3.3.1.3. Određivanje udjela ukupnih proteina	58
3.3.1.4. Određivanje udjela pepela.....	59
3.3.1.5. Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana, kiselih detergent vlakana i kiselog detergent lignina	60
3.3.1.6. Određivanje udjela ukupnog organskog ugljika, ukupnog ugljika i anorganskog ugljika	62
3.3.1.7. Određivanje udjela reducirajućih šećera	63
3.3.1.8. Određivanje udjela ukupnog organskog ugljika u ekstraktima tropa grožđa	64

3.3.1.9.	Određivanje udjela ukupnog dušika.....	64
3.3.1.10.	Određivanje udjela pojedinačnih šećera.....	65
3.3.1.11.	Određivanje udjela topljivih proteina Bradfordičinom metodom	65
3.3.2.	Određivanje udjela fenolnih spojeva	66
3.3.2.1.	Priprema ekstrakata tropa grožđa.....	66
3.3.2.2.	Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva.....	67
3.3.2.3.	Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida	68
3.3.2.4.	Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina.....	69
3.3.2.5.	Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva	70
3.3.2.6.	Određivanje koncentracije pojedinačnih antocijana	71
3.3.3.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	72
3.3.3.1.	DPPH metoda	72
3.3.3.2.	ABTS metoda	73
3.3.3.3.	FRAP metoda.....	74
3.3.4.	Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa ionskim geliranjem.....	75
3.3.4.1.	Ionsko geliranje pomoću šprice - optimiranje uvjeta inkapsulacije	75
3.3.4.2.	Ionsko geliranje pomoću inkapsulatora	78
3.3.4.3.	Stabilizacija hidrogelova sušenjem.....	81
3.3.5.	Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa sušenjem zamrzavanjem	81
3.3.6.	Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa sušenjem raspršivanjem	83
3.3.7.	Karakterizacija inkapsulata	84
3.3.7.1.	Određivanje geometrijskih parametara inkapsulata računalnom analizom slike	84
3.3.7.2.	Ispitivanje teksturalnih parametara inkapsulata	86
3.3.7.3.	Ispitivanje morfologije inkapsulata pretražnim elektronskim mikroskopom.....	87
3.3.7.4.	Ispitivanje toplinskih svojstva uzoraka diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom	87
3.3.7.5.	Ispitivanje kristaličnosti uzoraka rendgenskom difrakcijom praha.....	87
3.3.7.6.	Analiza veličine inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem	88
3.3.8.	Simulacija probave u <i>in vitro</i> uvjetima	89
3.3.8.1.	<i>In vitro</i> otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva.....	90
3.3.8.2.	Određivanje biodostupnosti fenolnih spojeva	91
3.3.9.	Kinetika otpuštanja inkapsuliranih fenolnih spojeva.....	97
3.3.10.	Statistička obrada podataka	98
4.	REZULTATI I RASPRAVA	99
4.1.	KEMIJSKI SASTAV TROPA GROŽĐA	101
4.2.	ODREĐIVANJE PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA IZ TROPA GROŽĐA.....	104
4.3.	MASENI UDIO UKUPNIH I POJEDINAČNIH FENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA TROPA GROŽĐA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA	107
4.4.	INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA METODOM IONSKOG GELIRANJA ..	112
4.4.1.	Optimiranje uvjeta inkapsulacije ionskim geliranjem	112
4.4.2.	Karakterizacija inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova	116
4.4.2.1.	Učinkovitost inkapsulacije ionskim geliranjem – utjecaj omotača	117
4.4.2.2.	Veličina, oblik i morfologija inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova	119
4.4.2.3.	Tekstura inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova.....	128
4.4.2.4.	<i>In vitro</i> otpuštanje fenolnih spojeva iz suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem - utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova.....	129
4.4.2.5.	Opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz suhih inkapsulata matematičkim modelima.....	135

4.4.3.	Karakterizacija različitih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i ekstrakta.....	142
4.4.3.1.	Učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva ionskim geliranjem za različite inkapsulate - utjecaj omotača i ekstrakta.....	143
4.4.3.2.	Geometrijski parametri, tekstura i morfologija različitih suhih inkapsulata - utjecaj omotača i ekstrakta	144
4.4.3.3.	Termofizikalna analiza strukture omotača, ekstrakata i njihovih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem.....	149
4.4.3.4.	Profil i kinetika otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz različitih suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem.....	151
4.4.4.	Biodostupnost fenolnih spojeva iz različitih suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem - utjecaj omotača i ekstrakta	158
4.4.4.1.	Biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoids i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina.....	159
4.4.4.2.	Biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva.....	165
4.5.	INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA METODOM SUŠENJA ZAMRZAVANJEM.....	173
4.5.1.	Učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva sušenjem zamrzavanjem za različite inkapsulate - utjecaj omotača i ekstrakta.....	174
4.5.2.	Morfologija različitih inkapsulata dobivenih metodom sušenja zamrzavanjem.....	175
4.5.3.	Termofizikalna analiza različitih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem	176
4.5.4.	Profil i kinetika otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem.....	178
4.5.5.	Biodostupnost fenolnih spojeva iz različitih ekstrakata i njihovih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem - utjecaj omotača i ekstrakta	182
4.5.5.1.	Biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina.....	182
4.5.5.2.	Biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva.....	187
4.6.	INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM	194
4.6.1.	Učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva sušenjem raspršivanjem za različite inkapsulate - utjecaj omotača i ekstrakta.....	194
4.6.2.	Morfologija različitih inkapsulata dobivenih metodom sušenja raspršivanjem	196
4.6.3.	Termofizikalna analiza različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem	198
4.6.4.	Profil i kinetika otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem.....	200
4.6.5.	Biodostupnost fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem - utjecaj omotača i ekstrakta.....	205
4.6.5.1.	Biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina.....	205
4.6.5.2.	Biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva.....	210
4.7.	USPOREDBA INDEKSA BIODOSTUPNOSTI FENOLNIH SPOJEVA – UTJECAJ METODE, OMOTAČA I EKSTRAKT	218
5.	ZAKLJUČCI.....	226
6.	LITERATURA.....	231
7.	PRILOZI	266
7.1.	Prilog 1. Inkapsulacija ionskim geliranjem.....	267
7.2.	Prilog 2. Inkapsulacija sušenjem zamrzavanjem.....	292
7.3.	Prilog 3. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem	305

Popis oznaka, kratica i simbola

Oznake

A	površina sloja masti koji je izložen koži
A	apsorbancija svjetlosti
a	površina (mm^2)
B	broj eksperimenata
β_0	konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
β_i	koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ii}	koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
β_{ij}	koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
C	koncentracija aktivne tvari koja ulazi u reakciju
C	maseni udio ($\text{mg/g}_{\text{s.tv.}}$); ($\text{mg } (\mu\text{g})/100 \text{ g}_E$); (mg/g_N)
C'	masena koncentracija (mg/mL)
$C_{0(\text{ini})}$	početna koncentracija aktivne tvari
C_p	broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki
C_s	topljivost aktivne tvari; koncentracija zasićene otopine
$C(t)$	koncentracija otpuštene aktivne tvari u otapalu u vremenu t
D	konstanta difuzije
d	promjer čestica (mm , μm)
DF	faktor razrjeđenja
D_f	koeficijent difuzije
$\frac{dc}{dx}$	koncentracijski gradijent
$\frac{dw}{dt}$	brzina promjene mase čestice s vremenom
ε	ekstincijski koeficijent ($\text{L/mol}\cdot\text{cm}$, $\text{mL}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$)
F	udio aktivne tvari (%) koja se oslobađa u vremenu t (min)
$Feret_{MAX}$	duljina (mm)
$Feret_{MIN}$	širina (mm)
h	udaljenost
J	količina tvari koja prolazi kroz jedinicu površine u jedinici vremena
k	broj faktora (ispitivanih varijabli)
k	konstanta brzine
k_1	konstanta brzine otpuštanja modela prvog reda
k_H	Higuchijeva konstanta otpuštanja

k_{HC}	Hixson-Crowellova konstanta otpuštanja
k_{KP}	Korsmeyer-Peppasova konstanta brzine otpuštanja
l	duljina optičkog puta (cm)
M	molekularna masa (g/mol)
M_t	kumulativna aktivne tvari otpuštena u vremenu t
M_∞	ukupna količina aktivne tvari dostupna za otpuštanje
m	masa (mg, g)
N	udio dušika (%)
n	eksponent otpuštanja/difuzije
O	opseg (mm)
P	površina pika
R	brzina reakcije
R^2	koeficijent determinacije
R_{adj}^2	prilagođeni koeficijent determinacije
S	površina čestice
$S.A.$	specifična aktivnost enzima (U/mg)
t	vrijeme (s, min, h)
V	volumen (μ L, mL, L)
w	masa čestice u vremenu t
w_0	početna masa čestice
$w_{s.tv.}$	udio suhe tvari u uzorku (%)
$X_{i,j}$	ispitivane nezavisne varijable
Y	modelom predviđena odzivna funkcija

Kratice

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol
ABTS $\cdot^+$	ABTS radikalski kation
AD	sušenje hidrogelova na zraku (<i>Air Drying</i>)
ADF	kisela detergent vlakna (<i>Acid Detergent Fiber</i>)
ADL	kiseli detergent lignin (<i>Acid Detergent Lignin</i>)
AIC	Akaike informacijski kriterij
BI	indeks biodostupnosti (<i>Bioaccessibility Index</i>)
BSA	goveđi serumski albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CE	ekvivalenti katehina (<i>Catechin Equivalents</i>)
CF	trop grožđa sorte cabernet franc

CLD	kemiluminiscentni detektor (<i>Chemiluminescence Detector</i>)
CPC	koncentracija ukupnih fenola u inkapsualtima (<i>Content of Total Phenols</i>)
CS	trop grožđa sorte cabernet sauvignon
DE	dekstrozni ekvivalent
DNS	3,5-dinitrosalicilna kiselina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH•	DPPH radikal
DSC	diferencijalna pretržana kalorimetrija (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrat
EE	učinkovitost inkapsualcije (<i>Encapsulation Efficiency</i>)
FD	sušenje hidrogelova zamrzavanjem (<i>Freeze Drying</i>)
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GA	guma arabika
GAE	ekvivalenti galne kiseline (<i>Gallic Acid Equivalents</i>)
GP	želučana faza probave (<i>Gastric Phase</i>)
GRAS	generalno prihvaćen kao siguran (<i>Generally Recognized as Safe</i>)
GT	guma tragacanth
IC	anorganski ugljik (<i>Inorganic Carbon</i>)
IG	ionsko geliranje
IP	crijevna faza probave (<i>Intestinal Phase</i>)
KZ	kitozan
M	trop grožđa sorte merlot
MDh	maltodekstrin dekstroznog ekvivalenta 16,5 – 19,5
MDl	maltodekstrin dekstroznog ekvivalenta 4 – 7
MSC	kriterij odabira modela
NA	natrijev alginat
NDF	neutralna detergent vlakna
NDF	neutralna detergent vlakna (<i>Neutral Detergent Fiber</i>)
NDIR	nedisperzivni infracrveni detektor (<i>Non-Dispersive Infrared</i>)
NIE	neinkapsualirani ekstrakt
NPOC	nehalapljivi organski ugljik (<i>Non-Purgeable Organic Carbon</i>)
OP	oralna faza probave (<i>Oral Phase</i>)
PDA	PDA detektor (<i>Photo Diode Array Detector</i>)
RID	RID detektor (<i>Refractive Index Detector</i>)
RSM	metoda odzivnih površina (<i>Response Surface Methodology</i>)

SD	standardna devijacija
SEM	pretražni elektronski mikroskop (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
SGF	probavna želučana otopina (<i>Simulated Gastric Fluid</i>)
SIF	probavna crijevna otopina (<i>Simulated Intestinal Fluid</i>)
SPC	koncentracija fenolnih spojeva na površini (<i>Surface Phenols Content</i>)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SR	sušenje raspršivanjem
SSF	probavna oralna otopina (<i>Simulated Salivary Fluid</i>)
SZ	sušenje zamrzavanjem
TAME	<i>p</i> -toluen-sulfonil-L-arginin metil ester
TC	ukupni ugljik (<i>Total Carbon</i>)
TCA	trikloroctena kiselina
TE	ekvivalenti troloksa (<i>Trolox Equivalent</i>)
TN	ukupni dušik (<i>Total Nitrogen</i>)
TNM-L	jedinica za mjerenje ukupnog dušika (<i>Total Nitrogen Measuring Unit</i>)
TOC	ukupni organski ugljik (<i>Total Organic Carbon</i>)
TPA	analiza profila teksture (<i>Texture Profile Analysis</i>)
TPZT	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin
UF	ukupni fenolni spojevi
UFL	ukupni flavonoidi
UHPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
UPA	ukupni ekstraktibilni proantocijanidini
VD	sušenje hidrogelova pod vakuumom (<i>Vacuum Drying</i>)
XPRD	rendgenska difrakcija praha (<i>X-Ray Powder Diffraction</i>)
ŽEL	želatina

Indeksi

E	ekstrakt
GLU	glukoza
gal.k.	koncentracija galne kiseline
IG	ionsko geliranje
IN	inkapsulati
M	masti
SP	slijepa proba

SR	sušenje raspršivanjem
s.tv.	suha tvar
SZ	sušenje zamrzavanjem
T	testna otopina enzima
TE	ekvivalenti troloksa (<i>Trolox Equivalent</i>)
TG	trop grožđa
uz	uzorak

ZA OČIENU

ZA OCJENU

1. UVOD

Održivost prehrambene industrije i očuvanje prirodnih resursa nameću se kao ključni izazovi 21. stoljeća u kontekstu rastuće svjetske populacije, povećanih potreba za hranom, ograničenih prirodnih resursa i sve izraženijeg problema u pogledu akumulacije i neadekvatnog zbrinjavanja otpadnih struja nastalih tijekom proizvodnje hrane. Suvremeni koncept kružnog biogospodarstva potiče transformaciju proizvodnih ostataka u vrijedne sirovine, čime se doprinosi smanjenju količine otpada, očuvanju okoliša te stvaranju proizvoda visoke dodane vrijednosti. U tom kontekstu, trop grožđa – kruti proizvodni ostatak vinarske industrije – predstavlja značajan, ali još uvijek nedovoljno iskorišten potencijal. Trop grožđa bogat je bioaktivnim komponentama, osobito fenolnim spojevima koji posjeduju izražena antioksidativna, protuupalna i antikancerogena svojstva. Unatoč njihovom znatnom bioaktivnom potencijalu, fenolne spojeve karakterizira visoka nestabilnost i ograničena bioraspoloživost, što otežava njihovu učinkovitost u organizmu nakon oralnog unosa.

Kako bi se prevladali ti izazovi, posljednjih godina sve više je istraživanja usmjereno na razvoj različitih metoda inkapsulacije – postupak kojim se bioaktivni spojevi obavijaju zaštitnim materijalima radi povećanja njihove stabilnosti, zaštite od nepovoljnih vanjskih utjecaja (pH, oksidacije, izloženosti svjetlosti i toplini), prikrivanja neželjenih mirisa i okusa te postizanja njihovog kontroliranog otpuštanja u ciljanim dijelovima probavnog sustava. Među različitim metodama inkapsulacije, ionsko geliranje ističe se kao jednostavna, ekološki prihvatljiva metoda koja se provodi u blagim procesnim uvjetima, bez potrebe za visokim temperaturama i agresivnim kemikalijama. Temelji se na sposobnosti polianionskih biopolimera (najčešće natrijevog alginata) da u prisutnosti bivalentnih kationa (najčešće Ca^{2+}) formiraju trodimenzionalnu mrežastu strukturu – gel matriks unutar kojeg se mogu zarobiti bioaktivne tvari. Ova metoda omogućuje visoku učinkovitost inkapsulacije, očuvanje osjetljivih aktivnih tvari i potencijal za kontrolirano otpuštanje aktivne tvari na ciljano mjesto apsorpcije u organizmu.

U ovom radu istražena je mogućnost inkapsulacije ekstrakata bogatih fenolnim spojevima iz tri uzorka tropa grožđa (cabernet sauvignon, cabernet franc i merlot) primjenom metode ionskog geliranja te omotača prirodnog porijekla. Kao osnovni omotač korišten je natrijev alginat, dok su u drugim formulacijama ispitane njegove kombinacije sa gumom arabikom, gumom tragacanth, želatinom, maltodekstrinima i kitozanom. Odabir ovih omotača temelji se na njihovoj netoksičnosti, biorazgradivosti i tehnološkoj prikladnosti za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Osim što omogućuju stvaranje stabilnih gel matriksa, navedeni omotači posjeduju povoljna reološka svojstva poput visoke sposobnosti zadržavanja vode,

odgovarajuće viskoznosti i elastičnosti te sposobnosti stvaranja trodimenzionalnih mrežastih struktura potrebnih za učinkovito inkapsuliranje i kontrolirano otpuštanje bioaktivnih spojeva.

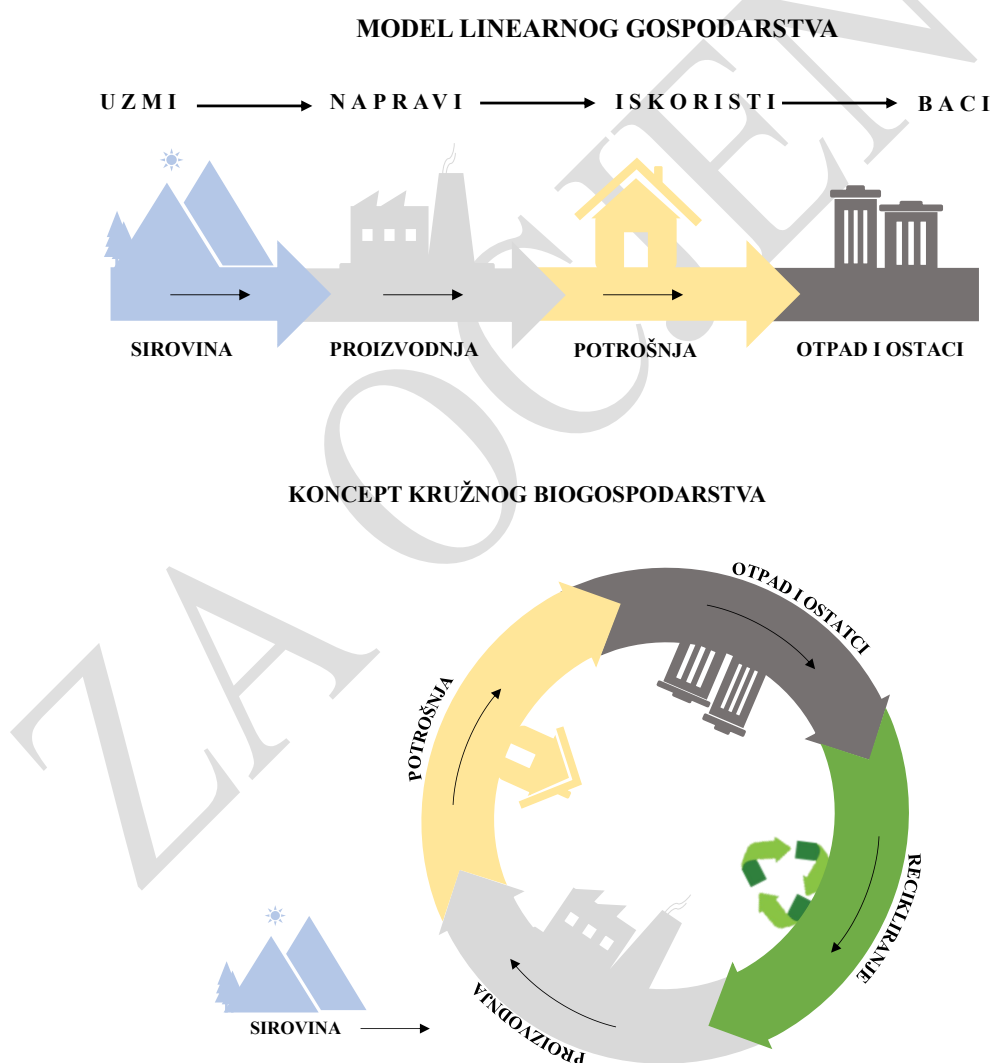
Cilj ovog rada bio je razviti i optimirati proces inkapsulacije fenolnih ekstrakata tropa grožđa ionskim geliranjem koristeći omotače prirodnog porijekla s krajnjim ciljem povećanja stabilnosti i biodostupnosti fenolnih spojeva u probavnom traktu u odnosu na neinkapsulirane ekstrakte. U okviru rada provedena je sveobuhvatna fizikalno-kemijska, strukturna i funkcionalna karakterizacija inkapsulata (geometrijski parametri, tekstura, morfologija površine, termofizikalna svojstva, kristaličnost/amorfnost, učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva, otpuštanje fenolnih spojeva tijekom simulirane probave *in vitro* te njihova biodostupnost nakon simulirane probave *in vitro*). Osim toga provedena je inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa s dodatne dvije metode, odnosno inkapsulacija sušenjem zamrzavanjem i inkapsulacija sušenjem raspršivanjem te su uspoređeni rezultati ostvarene biodostupnosti fenolnih spojeva s obzirom na primijenjenu metodu, omotač i ekstrakt.

ZA OCJENU

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRENDVI U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI – ODRŽIVO I KRUŽNO BIOGOSPODARENJE

Svjetska populacija, prema demografskom izvješću iz 2024., iznosi 8,2 milijarde ljudi, a prema Ujedinjenim narodima očekuje se da će nastaviti rasti tijekom sljedećih 50 do 60 godina, dosegnuvši vrhunac od oko 10,3 milijarde ljudi sredinom 2080-ih (United Nations, 2024). Ovaj porast stanovništva potiče povećanu potražnju za hranom i prirodnim resursima što ne može biti zadovoljeno trenutnim modelom linearnog gospodarstva zbog njegovih ograničenja i dugoročne neodrživosti (Slika 2.1).



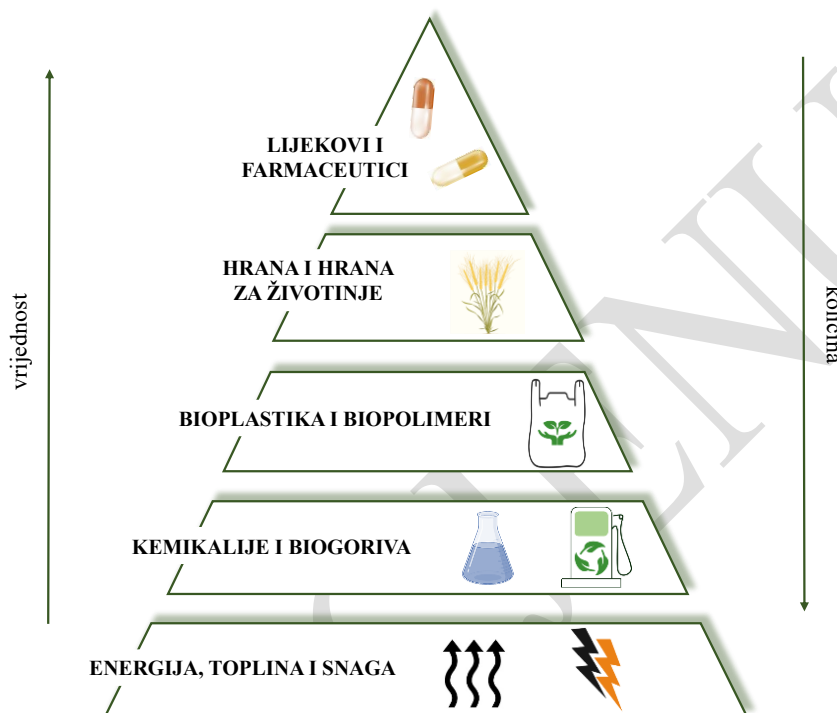
Slika 2.1 Prikaz modela neodrživog linearnog gospodarstva i koncepta održivog kružnog biogospodarstva

Naime, model linearnog gospodarstva temelji se na neodrživom okviru „uzmi – napravi – iskoristi – baci”, u kojem se prirodni resursi koriste za proizvodnju, koriste se, a zatim bacaju kao otpad bez ponovne upotrebe. Glavni nedostaci ovog modela uključuju neodrživo iskorištavanje resursa, proizvodnju velikih količina otpada, zagađenje okoliša i emisije stakleničkih plinova koje doprinose globalnom zatopljenju (Jørgensen i Pedersen, 2018; Upadhyay i Alqassimi, 2018).

U novije vrijeme teži se prelasku na koncept kružnog održivog biogospodarstva kao odgovora na nedostatke modela linearnog gospodarstva. Kružno biogospodarstvo transformira tradicionalne obrasce proizvodnje i potrošnje prema sustavu obnove i regeneracije sirovina (**Slika 2.1**) (Del Borghi i sur., 2020). Ova održiva strategija promiče korištenje i ponovnu uporabu otpada i proizvodnih ostataka kako bi se osigurala opskrba hrane rastućoj populaciji, smanjio gubitak sirovina te proizveli proizvodi s dodanom vrijednošću (Pagotto i Halog, 2016).

U kontekstu prehrambene industrije, kružno biogospodarstvo predstavlja sustav koji ima za cilj smanjiti gubitke hrane te primijeniti prikladne tehnologije kako bi se transformirao otpad, koji nastaje tijekom proizvodnje hrane, u proizvode s dodanom vrijednosti (FAO, 2011). Prema istraživanju Stenmarck i suradnika (2016), godišnje se u Europskoj uniji generira oko 88 milijuna tona otpada povezanog s hranom, uključujući jestivi otpad i nejestive dijelove vezane uz prehrambenu industriju. Najnoviji podaci Eurostata za 2024. godinu ukazuju da se godišnje stvori više od 59 milijuna tona otpada isključivo od hrane (Eurostat, 2024). Unatoč određenom napretku u prelasku s linearnog na kružni model gospodarstva, manje od 10 % svjetskog biogospodarstva trenutačno koristi kružni model (de Wit i sur., 2018). Proizvodni ostaci poljoprivredno-prehrambene industrije zbog svog kemijskog sastava (bioaktivni spojevi, enzimi, vitamini, minerali, proteini, šećeri i dr.) imaju potencijal iskorištavanja u različite svrhe kao što su proizvodnja suplemenata i funkcionalnih proizvoda, dodaci u proizvodnji stočne hrane, ali koriste se i kao polazna sirovina u proizvodnji biogoriva (Sagar i sur., 2018). Prikaz mogućnosti dobivanja bioproizvoda različite vrijednosti iz biomase ilustriran je na **Slici 2.2**, gdje su prikazane različite skupine proizvoda uključujući manje količine proizvoda više dodane vrijednosti (vrh piramide) poput farmaceutskih i prehrambenih proizvoda, preko biopolimera i kemikalija do proizvodnje energije, topline i snage odnosno proizvoda niže vrijednosti koji se proizvode u većim količinama (baza piramide). Važan element kružnog biogospodarstva je kaskadno iskorištavanje biomase, što podrazumijeva korištenje iste biomase u proizvodnji više različitih proizvoda u nizu, čime se postiže smanjenje nastanka otpada i povećava njegovo recikliranje i ponovna uporaba te povećava učinkovitosti i vrijednosti biomase prije konačnog

odlaganja (**Slika 2.2**) (Jurgilevich i sur., 2016). Teoretski, ovo kaskadno iskorištavanje biomase bi slijedilo kretanje prema dolje po piramidi vrijednosti bioproizvoda, prelazeći s visokovrijednih na niže vrijedne primjene biomase. Ovaj pristup ne samo da smanjuje potrošnju energije i sirovina, već ima sveobuhvatan utjecaj na društvo, ekonomiju i okoliš (Sharma i sur., 2020).



Slika 2.2 Piramida proizvoda, iz biomase, s dodanom vrijednošću koji se mogu proizvesti iz ostataka poljoprivredno-prehrambene industrije (prilagođeno prema Lange i sur., 2012)

Nažalost, unatoč njihovom potencijalu, proizvodni ostaci često se ne iskorištavaju dovoljno u proizvodnim procesima. Umjesto toga, klasificiraju se kao otpad i odlažu na odlagališta ili ostavljaju na poljima, što uzrokuje degradaciju cijelog ekosustava i iscrpljivanje resursa (Shafiee-Jood i Cai, 2016). Prema tome, kružno biogospodarstvo otvara put ka održivoj budućnosti prehrambene industrije. Iskorištavanje proizvodnih ostataka, smanjenje gubitaka hrane i prelazak na kružne prakse ključni su koraci prema osiguranju stabilne opskrbe hranom za rastuću populaciju, istovremeno štiteći okoliš i optimizirajući resurse (Fidelis i sur., 2019; Jiménez-Moreno i sur., 2020).

2.2. TROP GROŽĐA

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najviše uzgajanih kultura na svijetu s prosječnom površinom pod lozom od 7,4 milijuna ha/godišnje i proizvodnjom grožđa od 106 milijuna t/godišnje (podaci za razdoblje 2013. – 2022.) (OIV, 2023). Grožđe se uzgaja za konzumaciju u svježem obliku ili se prerađuje u razne proizvode poput vina, džema, soka, želea, groždica, octa te ulja iz sjemenki grožđa. Prema istraživanjima, gotovo 80 % ukupne proizvodnje grožđa usmjerava se u proizvodnju vina (Zhu i sur., 2015), što rezultira proizvodnjom vina od približno 27 milijardi litara godišnje na svjetskoj razini (Amienyo i sur., 2014). Istraživanja o koristima vina za zdravlje ljudi stekla su poseban interes 1990-ih godina, uslijed „francuskog paradoksa“, gdje je uočeno da Francuzi, unatoč prehrani bogatoj zasićenim mastima i šećerima, imaju smanjenu učestalost koronarnih bolesti što se povezalo s visokom učestalošću konzumacije vina. Ovaj paradoks povezan je s prisutnošću fenolnih spojeva u vinu (Renaud i de Lorgeril, 1992). Od tada, potrošnja vina kontinuirano raste što je rezultiralo povećanom proizvodnjom vina, ali i povećanim nastajanjem proizvodnih ostataka vinarija.

Trop grožđa je čvrsti proizvodni ostatak vinarske industrije organskog porijekla koji nastaje tijekom procesa prešanja i/ili fermentacije ovisno o tehnološkom procesu vinifikacije, a čini 10 – 30 % mase od ukupno prerađenog grožđa (Muñoz-Bernal i sur., 2021). Ovaj proizvodni ostatak sastoji se od prešanih kožica bobica grožđa, djelomično razgrađenih stanica pulpe grožđa, sjemenki i ponekad peteljki grožđa.

Kemijski sastav tropa grožđa je izuzetno bogat te sadrži značajne udjele ukupnog ugljika (44,3 – 52,9 %) i dušika (1,2 – 4,5 %), šećera (2,7 – 49,1 %), proteina (7,0 – 23,5 %), tanina (12,1 – 22,3 %), lipida (8,2 – 13,5 %), pepela (4,7 – 9,5 %), ukupnih fenolnih spojeva (4,8 – 6,7 %). U najvećem udjelu nalaze se ukupna vlakana (42,6 – 74,5 %) od čega je 28,7 – 42,2 % lignina; 9,2 – 14,5 % celuloze; 4,0 – 10,3 % hemiceluloze i 3,7 – 6,2 % pektina (Bucić-Kojić i sur., 2017a) zbog čega se trop grožđa svrstava u lignoceluloznu biomasu. Uslijed bogatog kemijskog sastava trop grožđa smatra se vrijednim resursom za različite primjene. Primjerice, zbog visokog udjela biološki aktivnih tvari poput fenolnih tvari trop se samostalno koristiti kao dodatak prehrani s ciljem prevencije razvoja različitih bolesti modernog doba (kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, karcinomi i dr.) ili se može koristiti kao polazna sirovina u proizvodnji različitih visokovrijednih produkata (npr. enzimi, proteini, ulja, nutraceutici, biopolimeri, biosurfaktanti, biogoriva i dr.) (Garrido i Borges, 2013; Martins i sur., 2016). Nadalje, trop grožđa se može koristiti kao kompost (Santos i sur., 2016) ili dodatak

u proizvodnji stočne hrane (Dwyer i sur., 2014), a u novije vrijeme se razmatra i kao dodatak u građevinskim izolacijama s pomoću kojeg bi se mogla poboljšati toplinska izolacija (Muñoz i sur., 2014).

Međutim, trenutni načini zbrinjavanja i korištenja tropa grožđa još su uvijek neadekvatni i često neodrživi. Trop se uglavnom neplanski odlaže na polja ili se spaljuje, što može negativno utjecati na okoliš i uzrokovati niz problema. Primjerice, visok udio fenolnih spojeva smanjuje pH tropa grožđa, otežava njegovu biološku razgradnju te negativno utječe na pH tla i klijavost (Drevelegka i Goula, 2020). Osim toga, drugi ekološki problemi uključuju onečišćenje površinskih i podzemnih voda, neugodne mirise, privlačenje muha i štetočina koje mogu prenositi bolesti te smanjenje razine kisika u tlu i podzemnim vodama zbog prisutnosti tanina i drugih spojeva (Dwyer i sur., 2014).

2.3. FENOLNI SPOJEVI TROPA GROŽĐA

Fenolni spojevi predstavljaju najrasprostranjeniju skupinu sekundarnih metabolita biljaka, sintetiziranih putem šikiminske kiseline tijekom normalnog razvoja biljaka ili kao odgovor na različite okolišne stresove poput mikrobnih infekcija, ozljeda ili UV zračenja (Naczki i Shahidi, 2006). Ovi spojevi karakterizirani su prisutnošću najmanje jednog aromatskog prstena s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina, a njihova strukturna raznolikost rezultira brojnim klasifikacijama ovih spojeva. Glavne skupine fenolnih spojeva uključuju fenolne kiseline, flavonoide, tanine, stilbene i lignane, pri čemu svaka skupina ima specifične kemijske i biološke karakteristike (Manach i sur., 2004; Tsao, 2010).

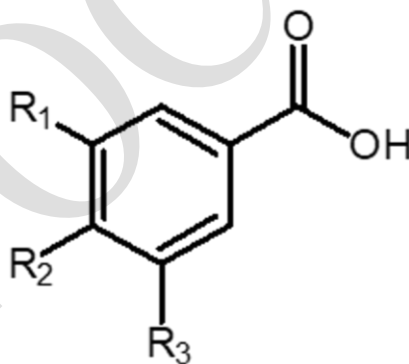
Trop grožđa obiluje fenolnim spojevima te se procjenjuje da se oko 70 % fenolnih spojeva prisutnih u grožđu zadržava u tropu nakon procesa prerade u vino (Dwyer i sur., 2014; González-Centeno i sur., 2014). Ovi spojevi imaju različite fiziološke učinke u ljudskom organizmu, uključujući antioksidativne, antialergijske, protuupalne, antimikrobne, antitrombotske i antikarcinogene učinke te kardioprotektivna svojstva (Silva i sur., 2020). Kemijski sastav tropa grožđa i udio fenolnih spojeva varira ovisno o mnogim faktorima, uključujući sortu grožđa, klimatske uvjete, agro-tehnološke uvjete uzgoja, tehnološke uvjete proizvodnje vina, stupanj zrelosti grožđa tijekom berbe te uvjete skladištenja (Rondeau i sur., 2013).

U dostupnoj znanstvenoj literaturi, naglasak se najčešće stavlja na proučavanje biološke aktivnosti fenolnih spojeva tropa, unatoč bogatom kemijskom sastavu i brojnim navedenim mogućnostima za održivo korištenje tropa grožđa.

2.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su građene od aromatskog prstena i sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu skupinu. Dijelev se na hidroksibenzojeve kiseline (**Slika 2.3**) i hidroksicimetne kiseline (**Slika 2.4**). U biljkama, fenolne kiseline se najčešće pojavljuju u vezanom obliku s drugim prirodnim spojevima kao esteri ili glikozidi, dok se rjeđe nalaze u slobodnom obliku (Kumar i Goel, 2019; Grgić i sur., 2020).

Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline s okosnicom od sedam ugljikovih atoma C6-C1 strukture (**Slika 2.3**). One mogu biti dostupne u vezanom obliku sa šećerima ili organskim kiselinama ili vezane za stanične komponente. Najzastupljenije hidroksibenzojeve kiseline uključuju galnu kiselinu, *p*-hidroksibenzojevu kiselinu, salicilnu kiselinu, elaginsku kiselinu, 3,4-dihidroksibenzojevu kiselinu, siringinsku kiselinu i vanilinsku kiselinu, a one se međusobno razlikuju na temelju modifikacije aromatskog prstena (Rashmi i Negi, 2020).

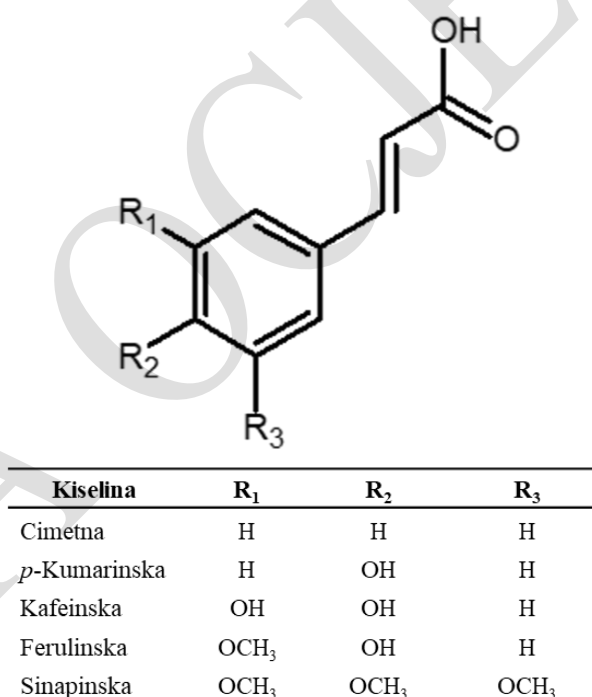


Kiselina	R ₁	R ₂	R ₃
Benzojeva	H	H	H
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva	H	OH	H
3,4-Dihidroksibenzojeva	OH	OH	H
Vanilinska	OCH ₃	OH	H
Siringinska	OCH ₃	OH	OCH ₃
Galna	OH	OH	OH

Slika 2.3 Osnovna kemijska struktura hidroksibenzojevih fenolnih kiselina (Grgić i sur., 2020)

Hidroksicimetne kiseline su derivati cimetne kiseline koji imaju okosnicu strukture C6-C3 i češće su prisutne u prirodi od hidroksibenzojevih kiselina (**Slika 2.4**). Obično se pojavljuju u različitim konjugiranim oblicima. Među njima su najčešće *p*-kumarinska kiselina, cimetna kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, izoferulinska kiselina i *p*-hidroksicimetna kiselina (Rashmi i Negi, 2020).

Fenolne kiseline djeluju kao antioksidansi na različite načine odnosno sprječavajući metalnu katalizu i neutralizirajući slobodne radikale. S obzirom na to, pridonose općem poboljšanju zdravlja, prvenstveno zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava (Tresserra-Rimbau i sur., 2018). Istraživanja su pokazala da imaju ulogu u sprječavanju kardiovaskularnih bolesti i različitih vrsta raka (Goleniowski i sur., 2013); štite od bolesti uzrokovanih oksidativnim oštećenjima te pokazuju antimikrobna, antimutagena, hipoglikemijska i antiagregacijska svojstva (Saxena i sur., 2012).

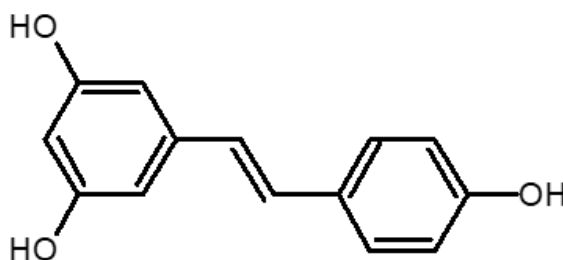


Slika 2.4 Osnovna kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Grgić i sur., 2020)

2.3.2. Stilbeni

Stilbeni, kategorizirani kao fitoaleksini, predstavljaju skupinu spojeva koje biljke sintetiziraju kao adaptivni odgovor na stresne uvjete (Beres i sur., 2017). Ovi spojevi, sastavljeni od dva

aromatska prstena povezana etilenskim mostom (**Slika 2.5**), ključan su element u obrambenom sustavu biljaka (Teixeira i sur., 2014). Stilbeni se nalaze u raznim dijelovima grožđa poput kože, peteljki i sjemenki.

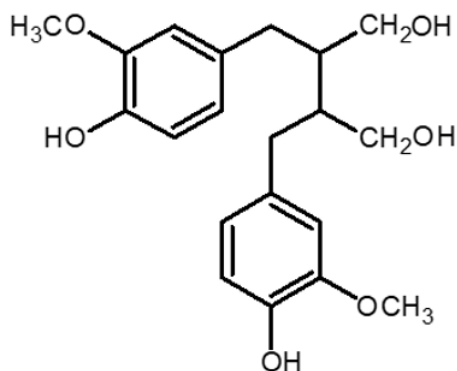


Slika 2.5 Kemijska struktura stilbena (Grgić i sur., 2020)

Najčešći predstavnik stilbena u grožđu, vinu, i povezanim vinskim proizvodima i proizvodnim ostacima je resveratrol (El Khawand i sur., 2018). Sadržaj stilbena može varirati među sortama grožđa, bilo da se radi o bijelom ili crvenom grožđu, pri čemu crveni kultivari često imaju veće udjele stilbena. Ove razlike u koncentraciji stilbena posljedica su složenih interakcija biotskih i abiotskih čimbenika, uključujući i različite metode prerade grožđa. Stilbeni su pokazali da posjeduju širok raspon bioloških aktivnosti potencijalno korisnih za ljudsko zdravlje, kao što su neuroprotektivni, antioksidativni i antitumorski učinci (Weiskirchen i Weiskirchen, 2016).

2.3.3. Lignani

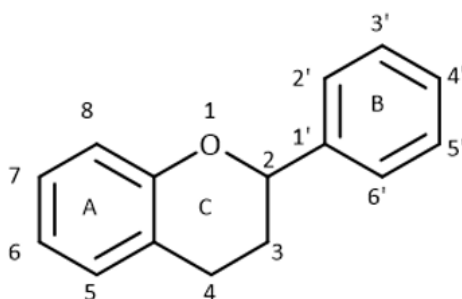
Lignani su fenolni dimeri koji posjeduju strukturu 2,3-dibenzilbutana (struktura C₆-C₃-C₃-C₆) (**Slika 2.6**) (Simpson i Amos, 2017). Većina lignana obično se slobodno pojavljuje u različitim izvorima hrane za ljude, dok se manji dio nalazi kao glikozidi u drvu i smoli nekih biljaka i kao takvi imaju prilično složenu kemijsku strukturu (Landete, 2012). Upravo zbog svoje raznolikosti, lignani pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antioksidativna, protuupalna, antivirusna i antikancerogena svojstva (Simpson i Amos, 2017). Lignani su česti sastojak hrane bogate vlaknima, kao što su proizvodi od cjelovitih žitarica (Landete, 2012). Također, mogu se pronaći u orašastim plodovima, sjemenkama uljarica, žitaricama, kruhu te voću, pri čemu koncentracija varira ovisno o biljnoj vrsti i uvjetima uzgoja (Manach i sur., 2004; Landete, 2012).



Slika 2.6 Kemijska struktura lignana (Grgić i sur., 2020)

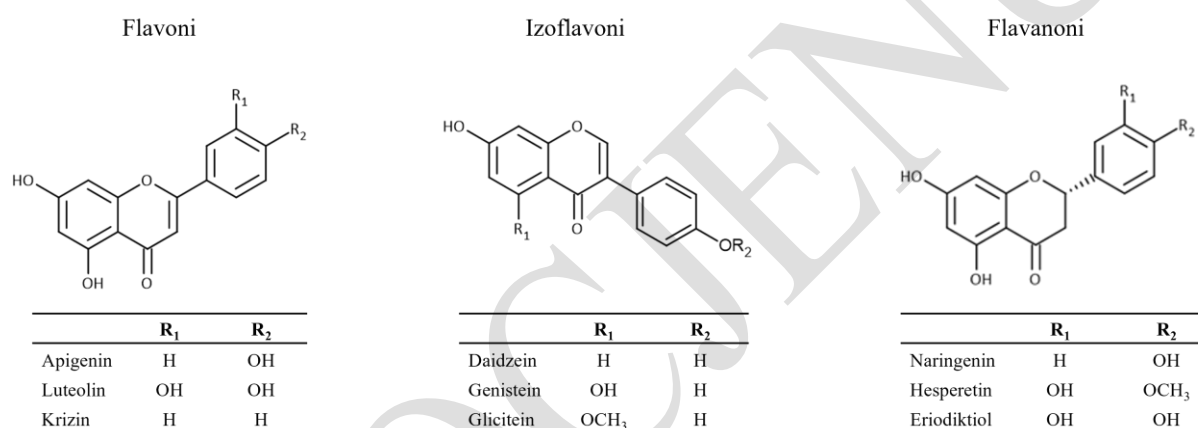
2.3.4. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najrasprostranjeniju skupinu fenolnih spojeva u biljnom svijetu. Njihova važnost proizlazi iz mnogostrukih pozitivnih biokemijskih i antioksidativnih učinaka koji su povezani s prevencijom različitih bolesti, uključujući između ostalih rak, Alzheimerovu bolest i aterosklerozu (Panche i sur., 2016). Flavonoidi imaju širok spektar povoljnih učinaka na promicanje zdravlja, a njihova antioksidativna, protuupalna, antimutagena i antikarcinogena svojstva čine ih važnim za održavanje i unapređenje zdravlja te zbog toga imaju važnu ulogu u raznim nutraceutskim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim primjenama (Metodiewa i sur., 1997). Struktura flavonoida temelji se na kosturu od 15 atoma ugljika (C6-C3-C6) koji se sastoji od dva benzenska prstena A i B povezana preko heterocikličkog prstena C koji sadržava kisik (Slika 2.7). Ovisno o razlikama u strukturnim značajkama, flavonoidi se dijele u različite podskupine flavonole, flavanole, izoflavone, flavone, flavanone i antocijane.



Slika 2.7 Osnovna kemijska struktura flavonoida (Grgić i sur., 2020a)

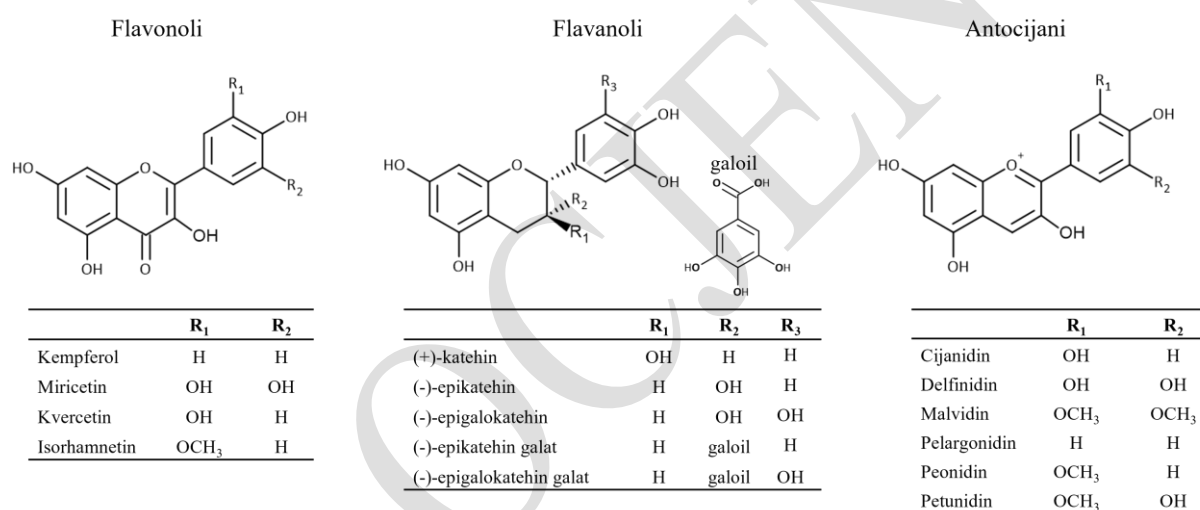
Flavoni, prisutni u listovima, cvjetovima i plodovima biljaka poput celera, peršina, crvene paprike, kamilice, mente i ginka bilobe, obično se javljaju u obliku glukozida (Manach i sur., 2004). *Izoflavoni*, pak, predstavljaju značajnu podskupinu flavonoida, često prisutnu u soji i drugim mahunarkama. Neki izoflavoni pronađeni su i u mikrobima, a igraju važnu ulogu kao prekursori za razvoj fitoaleksina tijekom interakcije biljnih mikroba (Aoki i sur., 2000). *Flavanoni*, poput onih u agrumima kao što su naranče, limun i grejp još su jedna značajna podskupina flavonoida (**Slika 2.8**). Sve ove podskupine flavonoida imaju antioksidativna, protuupalna, antimikrobna i neuroprotektivna svojstva. Također, povezujući se sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti i drugih kroničnih bolesti mogu pridonijeti općem zdravlju i dobrobiti organizma (Panche i sur., 2016).



Slika 2.8 Kemijska struktura flavona, izoflavona i flavanona (Grgić i sur., 2020)

Flavanoli, kao podskupina flavonoida, često se nalaze u sjemenkama grožđa i obično su prepoznatljivi po žutoj boji ili su pak bezbojni. Među često prisutnim flavanolima u grožđu, uključujući i trop grožđa, su miricetin, kvercetin i kempferol (**Slika 2.9**) (Cosme i sur., 2018). Istraživanja pokazuju da proizvodni ostaci crvenih kultivara grožđa obiluju većim koncentracijama flavonola u usporedbi s bijelim (Teixeira i sur., 2014). *Flavanoli* ili flavan-3-oli, predstavljaju izuzetno kompleksnu podskupinu flavonoida, obilno zastupljenu u širokom spektru voća i povrća (**Slika 2.9**) (Beres i sur., 2017). Ovi bioaktivni spojevi pokazuju značajan utjecaj na ključne parametre kvalitete vinskih proizvoda, uključujući trpkost, gorčinu, kiselost, slatkoću, viskoznost, aromu, boju te strukturu (Teixeira i sur., 2014). U tropu grožđa, flavanoli su uz fenolne kiseline najzastupljeniji fenolni spojevi, a najčešće prisutni predstavnici su (+)-katehin, (–)-epikatehin, (–)-epikatehin galat te oligomerni i polimerni procijanidini. Flavanoli se često pojavljuju u kondenziranom obliku u obliku oligomernih i polimernih struktura, poznatih kao kondenzirani tanini. Crvene i bijele sorte vina razlikuju se u profilu i koncentraciji

flavanola, pri čemu crvene sorte obično sadrže veću količinu i raznolikost ovih spojeva, osobito u pokožici i sjemenkama (Beres i sur., 2017). *Antocijani*, crveni biljni pigmenti, predstavljaju ključne fenolne spojeve u crvenim sortama grožđa te njihovim proizvodnim ostacima (Beres i sur., 2017). Ovi spojevi su prepoznati kao antioksidansi (Rockenbach i sur., 2011) i antimikrobeni (Caldas i sur., 2018). Topljivi su u vodi, a osjetljivi na pH, svjetlo, prisutnost kisika, enzima, askorbinske kiseline, sumporovog dioksida i metalnih iona (Beres i sur., 2017). Unatoč njihovoj nestabilnosti, istraživanja su usmjerena na njihovu potencijalnu upotrebu u prehrambenom sektoru zbog značajnog antioksidativnog potencijala i potencijalnih zdravstvenih dobrobiti (De Souza i sur., 2015). Glavni antocijani prisutni u tropu grožđa uključuju cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin 3-*O*-glikozid (Slika 2.9) (Kőrösi i sur., 2022).



Slika 2.9 Kemijska struktura flavonola, flavanola i antocijana (Grgić i sur., 2020)

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH TVARI IZ TROPA GROŽĐA

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz tropa grožđa predstavlja ključni korak u izolaciji i identifikaciji ovih važnih fitokemikalija. Postoje različite metode koje se koriste u tom procesu, s naglaskom na konvencionalne i alternativne metode ekstrakcije (Wang i sur., 2020).

Konvencionalne metode ekstrakcije (npr. soxlet ekstrakcija, perkolacija, maceracija, itd.) fenolnih spojeva obuhvaćaju postupke ekstrakcije uz primjenu otapala poput metanola, etanola, acetona, vode i njihovih smjesa. Iako su ove metode široko korištene, imaju određene nedostatke kao što je dugo trajanje, visoki utrošak otapala te niski prinosi ekstrakata i ciljanog analita zbog potencijalne toplinske degradacije. Dodatno, odlaganje i regeneracija otapala

predstavljaju ekološki izazov zbog mogućeg onečišćenja okoliša neodgovarajućim odlaganjem toksičnih otapala (Drevelegka i Goula, 2020).

U posljednjih nekoliko godina, razvijene su brojne alternativne metode ekstrakcije koje nadilaze nedostatke konvencionalnih metoda. Ove metode uključuju ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, ekstrakciju superkritičnim fluidima, ekstrakciju tekućinom pod tlakom, ekstrakciju pulsirajućim električnim poljem i ekstrakciju prirodnim eutektičkim otapalima. U usporedbi s konvencionalnim metodama, alternativne metode omogućuju bržu i učinkovitiju ekstrakciju, veću selektivnost prema ciljanim bioaktivnim spojevima, nižu potrošnju organskih otapala, te manje negativno djelovanje na okoliš. Dodatno, brojne od ovih metoda provode se pri nižim temperaturama, čime se smanjuje rizik od degradacije toplinski osjetljivih fenolnih spojeva. Osim toga, njihove kraće vrijeme obrade, energetska učinkovitost, te mogućnost prilagodbe industrijskim procesima čine ih privlačnim rješenjima za komercijalnu primjenu u ekstrakciji fenolnih spojeva iz agroindustrijskog otpada (Wang i sur., 2020).

S obzirom na strukturnu raznolikost fenolnih spojeva, ne postoji univerzalna metoda kojom bi se mogli učinkovito ekstrahirati svi fenolni spojevi stoga je potrebno optimirati svaki ekstrakcijski proces u odnosu na ključne procesne parametre. Najčešće korištena metoda ekstrakcije fenolnih spojeva iz tropa grožđa jest konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija čija učinkovitost ovisi o više faktora uključujući vrstu otapala, omjer otapalo-uzorak, veličinu čestica, temperaturu i trajanje ekstrakcije. Vrsta otapala ima ključnu ulogu jer određuje topljivost fenolnih spojeva koji su uglavnom polarni, pa se u tu svrhu najčešće koriste polarna otapala. U kontekstu ekološke prihvatljivosti i primjene u prehrambenoj industriji, etanol se preferira pred metanolom zbog niže toksičnosti i bolje sigurnosno-zdravstvene prihvatljivosti. Naime, etanol je, za razliku od metanola prihvaćen kao generalno sigurno otapalo (*Generally Recognized as Safe*; GRAS) od strane Europske agencije za sigurnost hrane te Stručnog odbora za prehrambene aditive Organizacije za prehranu i poljoprivredu (*Food and Agriculture Organization* – FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization* - WHO) (Teixeira i sur., 2014; Caldas i sur., 2018). Omjer otapalo-uzorak utječe na učinkovitost ekstrakcije kroz uspostavu koncentracijskog gradijenta te se povećanjem količine otapala često se postiže veći prinos, ali se pritom može doći i do razrjeđenja ekstrakta. Veličina čestica sirovine određuje ukupnu kontaktnu površinu s otapalom te manje čestice imaju veću površinu kontakata s otapalom pri čemu se povećava brzina difuzije i ubrzava prijenos mase što u konačnici doprinosi većoj ekstrakcijskoj učinkovitosti. Temperatura ekstrakcije značajno utječe

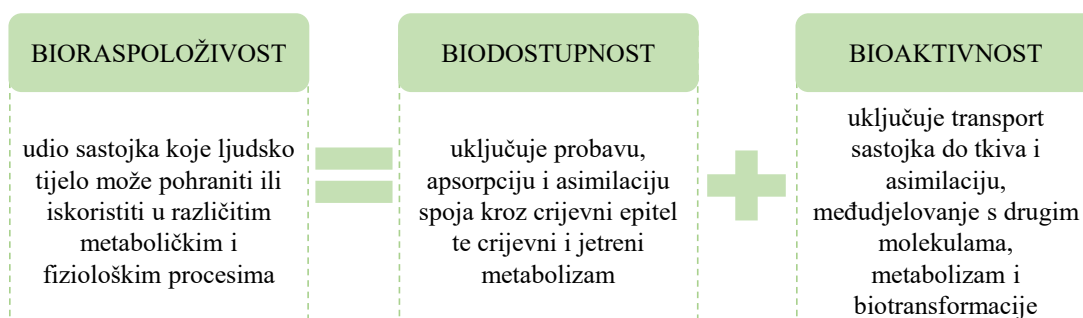
na kinetiku procesa. Povišena temperatura može povećati topljivost i brzinu difuzije fenolnih spojeva, no istodobno može uzrokovati termalnu degradaciju toplinski osjetljivih komponenata. Zbog toga je potrebno odrediti optimalnu temperaturu koja omogućuje visoku učinkovitost ekstrakcije uz očuvanje stabilnosti spojeva. Na kraju, vrijeme ekstrakcije također treba pažljivo prilagoditi budući da prekratko vrijeme procesa može rezultirati nepotpunom ekstrakcijom, dok produljeno trajanje ne mora dodatno povećati prinos, a može povećati rizik od oksidacije i razgradnje fenolnih spojeva.

2.5. BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA

Pojmovi biodostupnost, bioraspoloživost i bioaktivnost spojeva tema su brojnih znanstvenih istraživanja, ali se često međusobno miješaju i pogrešno interpretiraju. Za bolje razumijevanje učinka bioaktivnih spojeva, kao što su fenolni spojevi, ključno je jasno razgraničiti ove pojmove jer se oni odnose na različite faze njihova unosa, apsorpcije, metabolizma i biološkog djelovanja fenolnih spojeva u ljudskom organizmu.

- **Biodostupnost** (*Bioaccessibility*) označava udio spoja ili njegove frakcije koji se tijekom probave oslobađa iz matriksa hrane, čime postaje dostupan za apsorpciju i/ili asimilaciju u gastrointestinalnom sustavu (Rein i sur., 2013; Carbonell-Capella i sur., 2014). Predstavlja prvi preduvjet za bilo kakav biološki učinak.
- **Bioraspoloživost** (*Bioavailability*) obuhvaća širi pojam i uključuje ne samo biodostupnost, već i apsorpciju spoja kroz crijevnu membranu, njegov prijenos krvotokom, distribuciju u ciljna tkiva te sudjelovanje u metaboličkim procesima (Carbonell-Capella i sur., 2014). Drugim riječima, bioraspoloživost definira udio spoja koji organizam može učinkovito iskoristiti.
- **Bioaktivnost** (*Bioactivity*) odnosi se na specifične biološke učinke spoja, primjerice antioksidacijsko, protuupalno ili antikancerogeno djelovanje, i može se ostvariti samo ako je aktivna tvar prethodno biodostupna i bioraspoloživa.

Prikaz povezanosti ovih pojmova prikazan je na **Slici 2.10**.



Slika 2.10 Povezanost pojmova: bioraspoloživost, biodostupnost i bioaktivnost (prilagođeno prema Grgić i sur. (2020))

Zbog kemijske raznolikosti fenolnih spojeva te njihove slabe topljivosti i osjetljivosti na uvjete probavnog sustava, njihov se biološki učinak često ne ostvaruje u punom potencijalu. Osim toga, čimbenici poput obrade hrane, sastava matriksa hrane i interakcija s drugim komponentama dodatno otežavaju njihovu biodostupnost i bioraspoloživost (Siddiqui i sur., 2009; Tresserra-Rimbau i sur., 2018).

U sljedećim potpoglavljima ukratko su opisani glavni čimbenici koji utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva, procesi njihove probave u gastrointestinalnom sustavu te *in vitro* modeli koji se koriste za ispitivanje njihove biodostupnosti.

2.5.1. Faktori koji utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva

Na bioraspoloživost fenolnih spojeva utječe niz međusobno povezanih čimbenika, koji se mogu grupirati u tri osnovne kategorije: (1) kemijska svojstva samih spojeva, (2) svojstva matriksa hrane i (3) karakteristike probavnog sustava čovjeka (Rein i sur., 2013; Carbonell-Capella i sur., 2014).

Od kemijskih svojstava, posebnu ulogu ima molekularna struktura fenolnih spojeva uključujući broj i položaj hidroksilnih skupina, stupanj polimerizacije, prisutnost šećernih jedinica te oblik u kojem spoj postoji (slobodni, esterski ili glikozidni oblik). Spojevi s nižom molekularnom masom i jednostavnijom strukturom imaju veću sposobnost apsorpcije u tankom crijevu, dok se veće i kompleksnije molekule razgrađuju ili metaboliziraju u debelom crijevu, najčešće djelovanjem crijevne mikrobiote (Manach i sur., 2004; Crozier i sur., 2010). Uz strukturu, važnu ulogu ima i topljivost spoja. Budući da su mnogi fenolni spojevi slabo topljivi u vodi, to značajno ograničava njihovu biodostupnost. Lipofilniji spojevi se teže oslobađaju iz matriksa hrane i slabije difundiraju kroz crijevnu membranu, što dodatno otežava njihovu apsorpciju (Gao i Hu, 2010; Li i sur., 2015).

Sastav matriksa hrane, kao što su prisutnost masti, proteina, polisaharida ili vlakana, dodatno utječe na oslobađanje i apsorpciju fenolnih spojeva. Primjerice, masti mogu povećati apsorpciju lipofilnih fenola, dok dijetalna vlakna mogu vezati fenole i tako smanjiti njihovu dostupnost za apsorpciju (Rein i sur., 2013).

Među karakteristikama probavnog sustava koje utječu na bioraspoloživost fenolnih spojeva, najvažnije su promjene pH vrijednosti tijekom probave, prisutnost probavnih enzima, izlučivanje žučnih soli te aktivnost crijevne mikrobiote (Rein i sur., 2013; Carbonell-Capella i sur., 2014). Tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, pH se mijenja od kiselog u želucu do neutralnog ili blago alkalnog u crijevima što može utjecati na stabilnost i transformaciju fenolnih spojeva. Neki spojevi su osjetljivi na povišene pH vrijednosti, dok drugi postaju aktivniji tek nakon takvih promjena. Probavni enzimi, poput esteraza i glukozidaza, omogućuju hidrolizu fenolnih spojeva, čime olakšavaju njihovu apsorpciju u tankom crijevu. Žučne soli, koje se izlučuju u tankom crijevu, povećavaju topljivost lipofilnih spojeva i time povećavaju njihovu topljivost i dostupnost za apsorpciju. U debelom crijevu, crijevna mikrobiota razgrađuje fenolne spojeve koji nisu prethodno apsorbirani, pretvarajući ih u jednostavnije, biološki aktivne metabolite. Ti metaboliti mogu imati sličan ili čak jači biološki učinak od početnih spojeva, čime mikrobiota dodatno pridonosi ukupnoj bioraspoloživosti i bioaktivnosti fenola (Gao i Hu, 2010; Cardona i sur., 2013).

2.5.2. Probava fenolnih spojeva u gastrointestinalnom sustavu

Probava fenolnih spojeva u ljudskom organizmu uključuje niz mehaničkih, kemijskih i enzimskih procesa koji omogućuju njihovo oslobađanje iz matriksa hrane, transformaciju i potencijalnu apsorpciju u različitim dijelovima gastrointestinalnog sustava (**Slika 2.11**).

Proces probave započinje u usnoj šupljini, gdje se mehaničkom obradom i kontaktom sa slinom fenolni spojevi počinju oslobađati iz matriksa hrane (Corona i sur., 2014). Enzim amilaza, prisutan u slini, ima ograničen učinak na razgradnju fenolnih spojeva, dok kiselinski proteini koji se nalaze u ustima mogu stupiti u interakciju s fenolnim spojevima, posebno s proantocijanidinima, flavanolima i taninima, tvoreći s njima netopive ili slabije dostupne komplekse (Soares i sur., 2011; Bandyopadhyay i sur., 2012; Lewandowska i sur., 2013; Bohn, 2014; Corona i sur., 2014; Brandão i sur., 2020). Ove interakcije mogu utjecati na daljnju stabilnost i biodostupnost fenolnih spojeva u kasnijim fazama probave. Uz to, žvakanje hrane ima važnu ulogu jer smanjuje veličinu čestica, čime se povećava površina dostupna probavnim

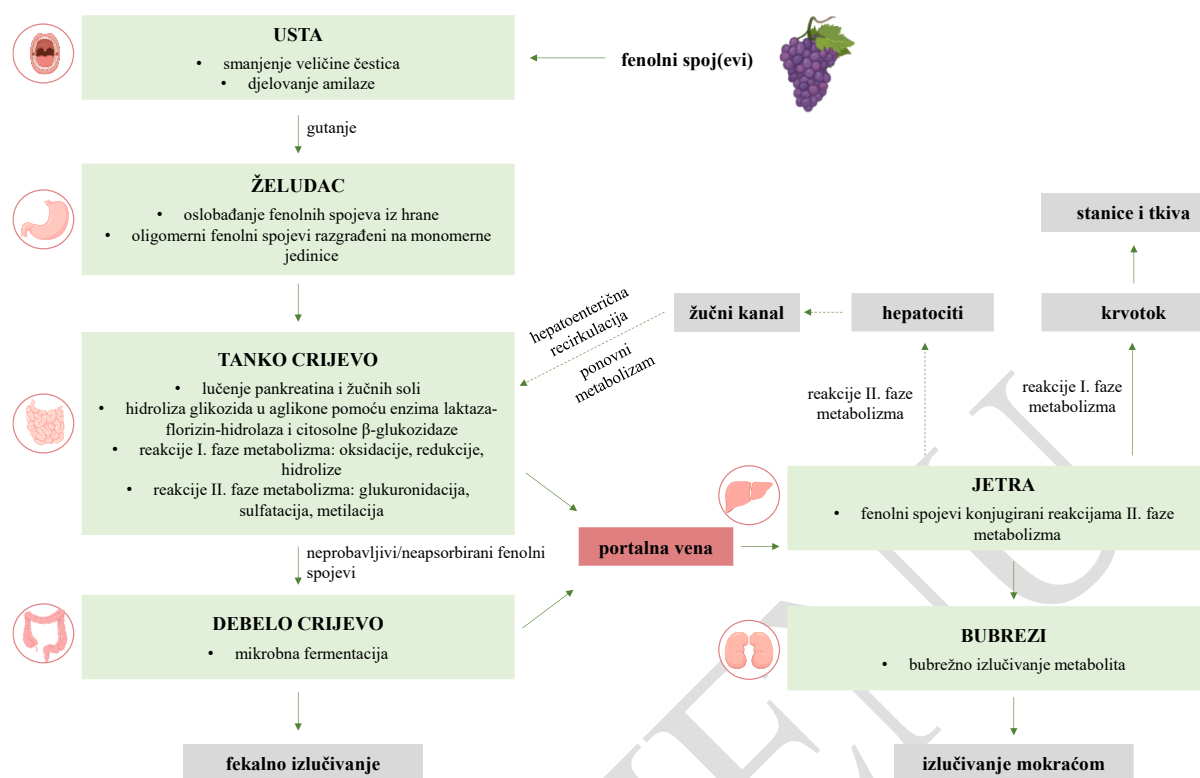
enzimima, što u konačnici može olakšati oslobađanje i apsorpciju fenolnih spojeva. U želucu, fenolni se spojevi oslobađaju pod djelovanjem niskog pH (2–4) i početnog procesa depolimerizacije, gdje se polimerni i oligomerni spojevi razgrađuju u manje, jednostavnije spojeve. Iako je želudac primarno odgovoran za fizičku i kemijsku razgradnju hrane, neke nestabilne fenolne molekule mogu se već ovdje djelomično transformirati.

U tankom crijevu, gdje pH raste (~ 7), ulogu preuzimaju pankreatin i žučne soli, koji potpomažu daljnje otapanje fenolnih spojeva. Apсорpcija jednostavnih fenola odvija se putem hidrolize glikozidnih veza, koju omogućuju:

- laktaza-florizin-hidrolaza – na površini crijevnih resica, i
- citosolna β -glukozidaza – unutar epitelnih stanica.

Apsorpcija malih fenolnih spojeva može se odvijati pasivnom difuzijom (djelovanjem laktaze-florizin-hidrolaze) ili aktivnim transportom putem natrij-ovisnog glukoznog transportera (citosolna β -glukozidaza) (D'Archivio i sur., 2010; Tarko i sur., 2013). Fenolni spojevi koji se ne apsorbiraju u tankom crijevu nastavljaju put prema debelom crijevu.

U debelom crijevu, glavnu ulogu ima crijevna mikrobiota, koju čini više od 10^{12} mikroorganizama po gramu crijevnog sadržaja. Budući da crijevna mikrobiota obavlja mnoge funkcije koje čovjekov organizam ne može samostalno provesti, često se naziva „superorganizmom“ (Kasote i sur., 2018). Kada je riječ o fenolnim spojevima, mikrobiota proizvodi enzime poput β -glukozidaze, β -ramnozidaze i esteraze, koji razgrađuju složene fenolne spojeve odnosno oligomere, glikozide, estere u jednostavnije metabolite. Ti metaboliti, zbog svoje jednostavnije strukture, mogu se lakše apsorbirati te pokazivati pojačanu ili izmijenjenu biološku aktivnost u usporedbi s izvornim spojevima (Kasote i sur., 2018; Tarko i sur., 2013).



Slika 2.11 Sažeti prikaz koraka uključenih u probavu fenolnih spojeva (prilagođeno prema Yang i sur., 2020)

2.5.3. *In vitro* statički model ispitivanja biodostupnosti fenolnih spojeva

Iako prethodno opisani procesi probave fenolnih spojeva opisuju stvarne fiziološke uvjete u ljudskom organizmu, njihova evaluacija u istraživanjima zahtijeva reprodukciju tih uvjeta u laboratoriju. U tu svrhu razvijeni su *in vitro* modeli probave, koji omogućuju procjenu biodostupnosti bez potrebe za *in vivo* eksperimentima. Budući da su *in vivo* ispitivanja skupa, vremenski zahtjevna i etički osjetljiva, sve se češće koriste *in vitro* modeli probave kao zamjena ili nadopuna stvarnim biološkim sustavima. Ti se modeli temelje na simulaciji fizioloških uvjeta gastrointestinalnog trakta, uključujući vrijeme probave, prisutnost i koncentraciju enzima, pH vrijednosti i temperature, koncentracije soli, a dijele se na statičke i dinamičke modele.

Statički modeli su jednostavniji i najčešće korišteni. U njima su uvjeti fiksni tijekom cijele simulacije, bez promjena u pH, sastavu enzima ili volumenu medija. Također, ne simuliraju se fiziološki procesi poput mehaničkog miješanja, peristaltičkog gibanja, postupnog otpuštanja enzima ili postupnog pražnjenja sadržaja, zbog čega su probavni produkti izloženi statičnim uvjetima bez dinamike transporta (Kong i Singh, 2010). Glavni nedostatak statičkih modela je što ne mogu u potpunosti replicirati dinamičke uvjete u ljudskom probavnom sustavu kao što

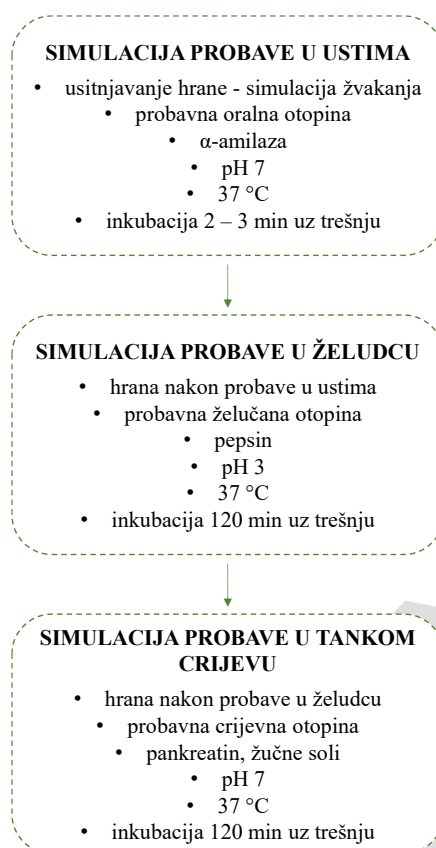
su postupne promjene pH vrijednosti, izlučivanje enzima i pražnjenje želuca te interakciju probavne hrane s crijevnom mikrobiotom. Unatoč svojim ograničenjima, statički modeli omogućuju brzu, ponovljivu i relativno pouzdanu procjenu biodostupnosti bioaktivnih spojeva. Njihova validacija se često provodi usporedbom s rezultatima dobivenima iz *in vivo* studija na ljudima i životinjskim modelima, pri čemu se može postići njihova vrlo dobra korelacija (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

S druge strane, dinamički modeli nude naprednije simulacije koje uključuju kontinuirane promjene fizikalno-kemijskih uvjeta, što omogućuje bolju usporedbu s *in vivo* podacima. Ipak, zbog visoke cijene, kompleksnosti i zahtjeva u opremi kod ovih modela, statički modeli i dalje se široko koriste u preliminarnim istraživanjima (Wojtunik-Kulesza i sur., 2020).

Jedan od najčešće korištenih standardiziranih modela je INFOGEST protokol koju su razvili Brodkorb i sur. (2019). Prema ovom protokolu, simulira se:

- oralna faza – inkubacija usitnjenog uzorka sa ili bez dodatka α -amilaze pri pH 7;
- želučana faza - hidroliza pepsinom pri pH 1–2 i
- crijevena faza – dodatak pankreatina i žučnih soli pri pH 6–7

unutar istog reaktora pri temperaturi od 37 °C. **Slika 2.12** prikazuje shemu tijeka i korištene parametre ovog *in vitro* statičkog modela simulirane probave.



Slika 2.12 Tijek i parametri *in vitro* statičkog modela simulirane probave prema INFOGEST standardiziranoj metodi (Brodkorb i sur., 2019)

2.6. INKAPSULACIJA FENOLNIH SPOJEVA

Inkapsulacija predstavlja proces u kojem se čvrste, tekuće ili plinovite tvari oblažu tankim slojem polimera, čime nastaju mikro- ili nanočestice, ovisno o postupku i veličini proizvedenih čestica. Sastojak, koji se inkapsulira, poznat je kao jezgra ili aktivna tvar, a materijal koji ga obavija omotač, nosač, premaz ili membrana (Eghbal i Choudhary, 2018). Inkapsulacija se najčešće provodi zbog zaštite aktivnih tvari od potencijalnih negativnih utjecaja kemijske oksidacije, enzimske razgradnje te ostalih faktora okoline (Jyothi i sur., 2010; Poshadri i Kuna, 2010) kao i zbog očuvanja željenih okusa, aroma i boja, te maskiranja potencijalno neugodnog izgleda, okusa i mirisa proizvoda (Ribeiro i sur., 2019).

Posljednjih godina, ova tehnologija intenzivno se istražuje kao perspektivna alternativa za očuvanje i poboljšanje svojstava ekstrakata dobivenih iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije te svojstava drugih aktivnih tvari koji nalaze primjenu u različitim industrijama (Aizpurua-Olaizola i sur., 2016; Akhavan Mahdavi i sur., 2016; Moreno i sur., 2018; Tsali i Goula, 2018).

Istraživanje inkapsulacije biljnih ekstrakata uključujući i ekstrakte dobivene iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije, (primjerice tropa grožđa iz vinarija) od posebnog je interesa zbog prisutnosti brojnih bioaktivnih spojeva u njima s posebnim naglaskom na fenolne spojeve. Fenolni spojevi pokazuju širok spektar bioloških učinaka, uključujući antioksidativna, antimikrobna, antifungalna, protuupalna i antidijabetička svojstva (Brezoiu i sur., 2019; Tolun i sur., 2020). Unatoč tim pozitivnim karakteristikama, stabilnost fenolnih spojeva može biti narušena različitim čimbenicima kao što su pH, prisutnost metalnih iona, izloženost svjetlu, temperaturi, kisiku i enzimskoj aktivnosti (Ballesteros i sur., 2017; Yamashita i sur., 2017). U kontekstu navedenog, inkapsulacija se ističe kao strategija koja značajno poboljšava stabilnost i bioraspoloživost fenolnih spojeva. Materijal za oblaganje aktivne tvari, ključna komponenta u procesu inkapsulacije, djeluje kao zaštitni omotač koji štiti fenolne spojeve od nepoželjnih reakcija razgradnje, istovremeno omogućavajući kontrolirano otpuštanje i ciljanu dostavu pod specifičnim uvjetima (Aizpurua-Olaizola i sur., 2016).

Pri odabiru metode inkapsulacije, nužno je uzeti u obzir niz faktora, uključujući veličinu čestica, fizikalno-kemijska svojstva aktivne tvari, vrstu omotača, mehanizme otpuštanja i ekonomske aspekte, odnosno troškove procesa (Akhavan Mahdavi i sur., 2016). Ovaj pristup omogućuje prilagođavanje procesa inkapsulacije prema specifičnim zahtjevima inkapsulacijskog sustava – inkapsulata (omotač + aktivna tvar) i njegovim željenim karakteristikama, istovremeno pridonoseći postizanju optimalne učinkovitosti procesa inkapsulacije i ekonomske isplativosti.

2.6.1. Omotači

Odabir omotača za inkapsulaciju temelji se na svojstvima aktivne tvari te fizikalno-kemijskim svojstvima omotača kao što su topljivost, molekularna težina, kristaličnost, viskoznost, sposobnost difuzije aktivne tvari kroz njega, sposobnost formiranje filma, emulgacijska svojstva, te otpornost na uvjete gastrointestinalnog trakta (Rezende i sur., 2018). Odabrani omotač treba biti inerten prema aktivnoj tvari koja se inkapsulira, kompatibilan s aktivnom tvari i omogućiti kontrolirano otpuštanje i ciljanu dostavu aktivne tvari (Favaro-Trindade i sur., 2010). Kada se koristi u prehrambenoj industriji, omotač mora imati GRAS svojstva, biti biorazgradiv, netoksičan i dovoljno stabilan da zaštiti aktivnu tvar tijekom obrade, skladištenja i prilikom konzumacije (Nedovic i sur., 2011). Omotači se uobičajeno dijele u tri glave skupine: polisaharide, lipide/masti i ulja, voskove te proteine. U idućim potpoglavljima bit će opisani omotači koji nalaze primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, a prirodnog su porijekla.

2.6.1.1. Polisaharidi

Najčešće korišteni omotači za inkapsulaciju su polisaharidi, jer imaju sposobnost povezivanja aktivne tvari u amorfnu jedinicu, čime omogućuju formiranje čvrstih i stabilnih čestica što pridonosi očuvanju integriteta inkapsulata tijekom proizvodnje i skladištenja (Labuschagne, 2018). Kada je cilj osigurati prijenos bioaktivnih tvari i njihovo kontrolirano otpuštanje u specifičnim dijelovima probavnog sustava, polisaharidi se ističu zbog sposobnosti zaštite inkapsulata od razgradnje u želucu, a mogu se ciljano razgraditi i osloboditi sadržaj u tankom ili debelom crijevu (De Vos i sur., 2010a). Na taj način, ovi materijali pokazuju značajnu ulogu u postizanju kontroliranog otpuštanja i ciljane dostave bioaktivnih sastojaka u određenim dijelovima gastrointestinalnog sustava gdje se odvija apsorpcija.

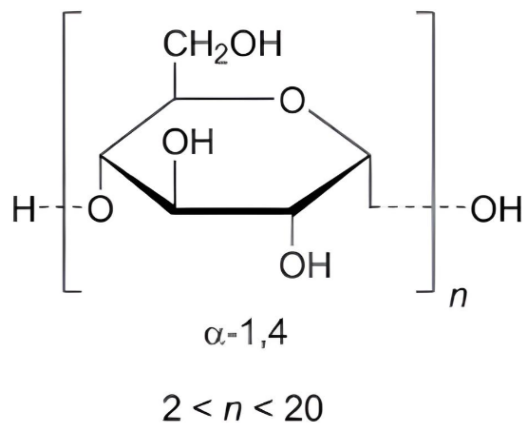
Škrob i derivati

Škrob je složeni polisaharid sastavljen od glukoznih jedinica povezanih α -D-glukozidnim vezama. Glavne komponente uključuju amilozu, linearni polimer α -D-glukoze, i amilopektin, razgranati polimer. Zbog svojih povoljnih svojstava emulgiranja i topljivosti, te ekonomske isplativosti, poput niske cijene i visoke dostupnosti, škrob se pokazao prikladnim materijalom za inkapsulaciju mnogih aktivnih tvari. Ipak često se modificira putem fizikalnih, kemijskih i biokemijskih metoda, stvarajući derivate (maltodekstrini, ciklodekstrini, acetilirani škrob, škrobni eteri) koji se češće koriste u usporedbi s nemodificiranim škrobom (Fernandes i sur., 2013). Ti derivati pokazuju potencijal u razvoju inovativnih proizvoda s poboljšanim okusom, nutritivnim i senzorskim svojstvima te produljenim rokom trajanja (Guo i sur., 2021).

Maltodekstrini, nastaju djelomičnom hidrolizom kukuruznog škroba uz pomoć kiselina ili enzima (**Slika 2.13**) (Labuschagne, 2018). Ovi derivati često se primjenjuju u raznim metodama inkapsulacije poput ekstruzije i sušenja raspršivanjem (Otálora i sur., 2015; Tackenberg i sur., 2015). Karakterizira ih termička stabilnost, neutralan okus, odsutnost mirisa i laka probavljivost (Munin i Edwards-Lévy, 2011; Tackenberg i sur., 2015).

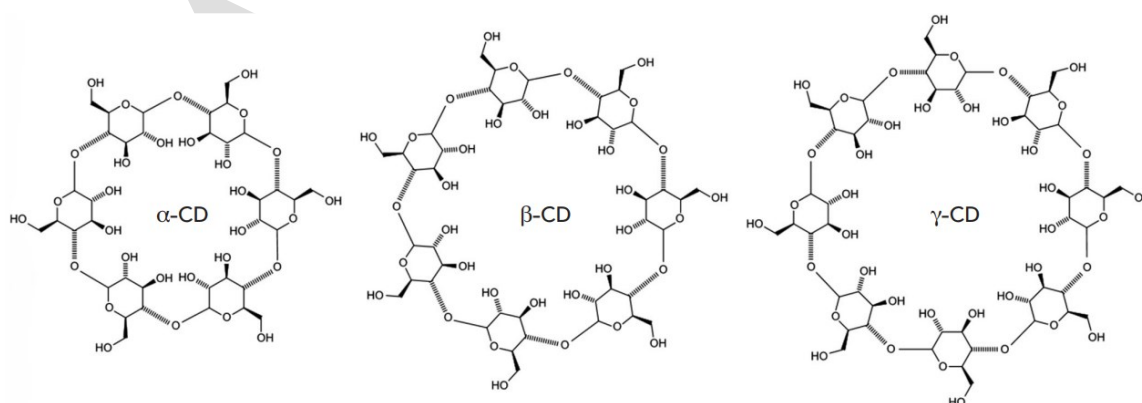
Kao alternativa maltodekstrinima, često se koristi inulin, fruktooligosaharid koji se komercijalno proizvodi iz cikoriје (Bakowska-Barczak i Kolodziejczyk, 2011; Labuschagne, 2018). Zbog svojstva viskoelastičnosti, inulin ima sposobnost formiranja mekanih inkapsulata s niskim stupnjem apsorpcije vode, što rezultira s povećanom stabilnosti inkapsuliranih komponenti (Botrel i sur., 2014; Labuschagne, 2018). Premda je inulin manje istraživani u

usporedbi s maltodekstrinima, ističe se kao prikladan omotač zbog svojih prebiotičkih svojstava i utjecaja na smanjenje rizika od pojavnosti raka debelog crijeva te potiče apsorpciju minerala i donosi brojne druge korisne učinke (Beirão-da-Costa i sur., 2013; Robert i Fredes, 2015; Labuschagne, 2018).



Slika 2.13 Kemijska struktura maltodekstrina (n = jedinice glukoze po lancu) (Cupone i sur., 2022)

Ciklodekstrini predstavljaju enzimatski modificirane škrobove s karakterističnim oblikom košare (**Slika 2.14**). Njihova struktura je takva da su iznutra hidrofobni, dok su izvana hidrofilni, što im omogućuje stvaranje kompleksa s različitim organskim spojevima (Marques, 2010; Pinho i sur., 2014). Ova jedinstvena struktura ciklodekstrina pridonosi sposobnosti formiranja kompleksa s različitim molekulama, a veličina šupljine ciklodekstrina omogućuje selektivnost u inkapsulaciji određenih komponenata (Szente i Fenyvesi, 2017).



Slika 2.14 Kemijska struktura tri vrste ciklodekstrina (α -, β - i γ -CD) sadržanih od šest, sedam i osam α -(1,4)-povezanih glikozilnih jedinice (Nikitenko i Prassolov, 2013)

Celuloza i derivati

Celuloza, široko rasprostranjen i obnovljiv polimer koji posjeduje izvrsna mehanička i kemijska svojstva, sastavljen je od β -D-glukoze čiji su lanci povezani β -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnim vezama (Mishra, 2016). Proizvodnja proizvoda od celuloze predmet je interesa znanstvenika koji rade u područjima kemije, kemijskog inženjerstva, biokemije i mnogih drugih područja vezanih uz dizajn bioloških materijala. Celuloza je podložna kemijskoj modifikaciji, omogućujući prilagodbu njezinih svojstava željenoj primjeni, a ima hidrofilne ili hidrofobne karakteristike, te može biti pozitivno ili negativno nabijena (Lukova i sur., 2023). Celuloza i derivati celuloze ključni su u inkapsulaciji zbog svojih raznovrsnih svojstava i sposobnosti prilagodbe specifičnim potrebama aktivne tvari koja se inkapsulira.

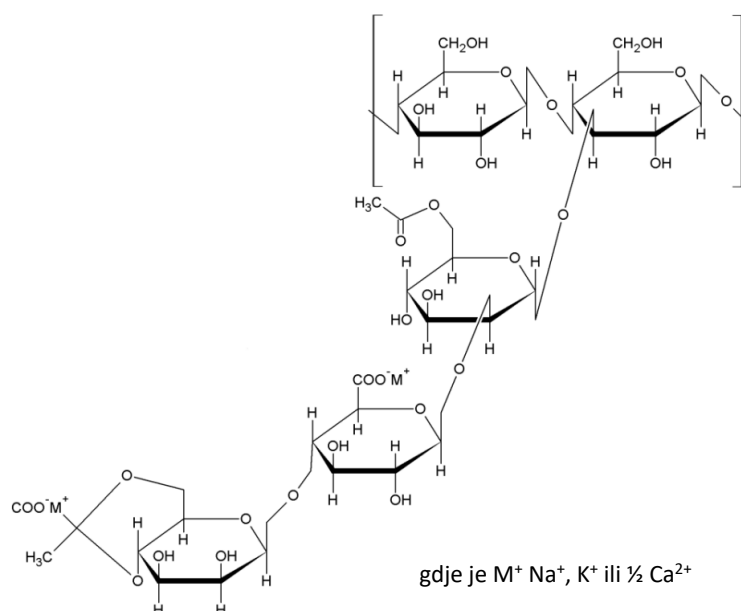
Među najčešće korištenim derivatima celuloze za inkapsulaciju ističu se eteri celuloze, uključujući metilcelulozu, hidroksipropil metilcelulozu, hidroksipropil celulozu i etilcelulozu. Metilcelulozu i hidroksipropil metilcelulozu odlikuju slična svojstva, a mogućnost stvaranja filmova čini ih izuzetno prikladnim derivatima celuloze za inkapsulaciju (Zhang i sur., 2015; Mohsenabadi i sur., 2018). Hidroksipropil celuloza je topljiva u vodi i/ili etanolu, pogodna je za inkapsulaciju u kombinaciji s drugim omotačima koji su topljivi u vodi, etanolu ili njihovoj mješavini, kao što su alginat, guar guma, želatina i pak neki drugi derivati celuloze (Astray i sur., 2009; Karewicz i sur., 2010; Karewicz i sur., 2014). Etilceluloza je prikladna za inkapsulaciju aktivnih tvari gdje je poželjno postići kontrolirano otpuštanje (Lokhande i sur., 2013).

Mikrobni polisaharidi

Mikrobni polisaharidi, poznati i kao mikrobni egzopolisaharidi, su vrsta biopolimera koje proizvode mnoge vrste gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, kao i drugi mikroorganizmi poput gljiva i određenih vrsta algi (Sutherland, 1999). Široka primjena mikrobni polisaharida u inkapsulaciji proizlazi iz njihovih raznovrsnih fizikalno-kemijskih svojstava.

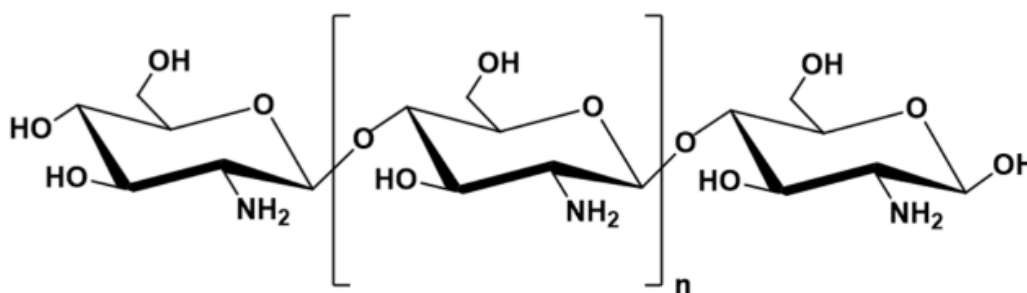
Ksantan i gelan gume, dekstrani i kitozan su neki od mikrobni polisaharida koje proizvode bakterije te često nalaze primjenu kao omotači, posebno u kombinaciji s drugim omotačima. Ksantan, anionski polielektrolit velike molekularne mase, proizvode bakterije *Xanthomonas*, a obično se koriste u obliku kalcijeve, kalijeve ili natrijeve soli (**Slika 2.15**) (Da Rosa i sur., 2013;

Mishra, 2016). Dekstrani su polisaharidi s linearnom polimernom okosnicom, nastali mikrobnom fermentacijom saharoze. Njihova varijabilna molekulska masa značajno utječe na brzinu njihove razgradnje u gastrointestinalnom traktu i time na oslobađanje inkapsulirane aktivne tvari (De Vos i sur., 2010a; Labuschagne, 2018).



Slika 2.15 Kemijska struktura ksantan gume (prilagođeno prema Wang i Wang, 2013)

Kitozan je biorazgradivi polisaharid dobiven djelomičnom deacetilacijom hitina (Da Rosa i sur., 2013; Mishra, 2016). Njegova linearna struktura sastoji se od N-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina povezanih β -(1 $\rightarrow$ 4) vezama (**Slika 2.16**). Kitozan sadrži polarne skupine poput OH i NH_2 koje imaju sposobnost doniranja elektrona. Zahvaljujući svojoj sposobnosti stvaranja filmova i gelova, kitozan je čest odabir u inkapsulaciji (Luo i Wang, 2013). Kitozan je topljiv u kiselim uvjetima te se često miješa s drugim polimerima poput alginata ili ksantana kako bi ostao stabilan u želučanoj kiselini i bio transportiran u tanko crijevo. Tamo se razgrađuje, omogućujući apsorpciju bioaktivnih tvari. Ovaj postupak pridonosi kontroliranom otpuštanju i poboljšanoj biodostupnosti inkapsuliranih aktivnih komponenti (Luo i Wang, 2013).



Slika 2.16 Kemijska struktura kitozana (Kumar i sur., 2020)

Biljni eksudati

Biljni eksudati (guma arabika, guma tragachant, guar guma, guma karaya i dr.) predstavljaju složene mješavine anorganskih i organskih molekula. Ovi spojevi prepoznati su po svojim biološkim učincima, uključujući antioksidativna, protuupalna, antimikrobna svojstva i mnoge druge pozitivne učinke (Licá i sur., 2018).

Guma arabika, jedan od najopsežnije proučavanih omotača u svim metodama inkapsulacije, ističe se svojim svojstvima stabilizacije emulzija, zadržavanja hlapljivih tvari, stvaranja filma, viskoznosti i topljivosti u vodi. Ovaj biljni eksudat luči drvo bagrema, posebice vrsta *Acacia senegal*, koja je rasprostranjena u Africi, Australiji, Indiji i Americi. Kemijski sastav arapske gume varira ovisno o vrsti i starosti drveta, klimatskim uvjetima te količini kiše i drugim čimbenicima. Glavne komponente uključuju galaktozu, arabinozu, ramnozu, glukuronsku kiselinu te male količine kovalentno vezanog proteina, što joj daje prethodno navedena funkcionalna svojstva (Mishra, 2016).

Gumu tragacanth proizvodi drvenasti zimzeleni grm roda *Astragalus*, karakterističan za pustinjske i planinske regije Azije (Imeson, 1992). Sastoji se od frakcije topljive u vodi uključujući tragacanthinsku kiselinu i malu količinu arabinogalaktana, te netopljive frakcije, basorina, koja bubri u vodi. Ova se guma smatra jednom od najotpornijih guma na kiselinu i najučinkovitijim prirodnim emulgatorom za kisele emulzije ulje u vodi te se često koristi kao stabilizator i zgušnjivač u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Weiping i Branwell, 2000). Fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva ove gume znatno ovise o vrsti grma roda *Astragalus*, što je ključno prilikom odabira odgovarajuće vrste gume tragacanth za određenu primjenu. Unatoč relativno visokoj cijeni, ova guma još uvijek privlači pažnju mnogih industrija zbog svojih izvanrednih i jedinstvenih svojstava. Međutim, održiva opskrba

gumom tragacanth glavni je problem koji ograničava njenu komercijalnu primjenu u mnogim industrijama (Nejatian i sur., 2020).

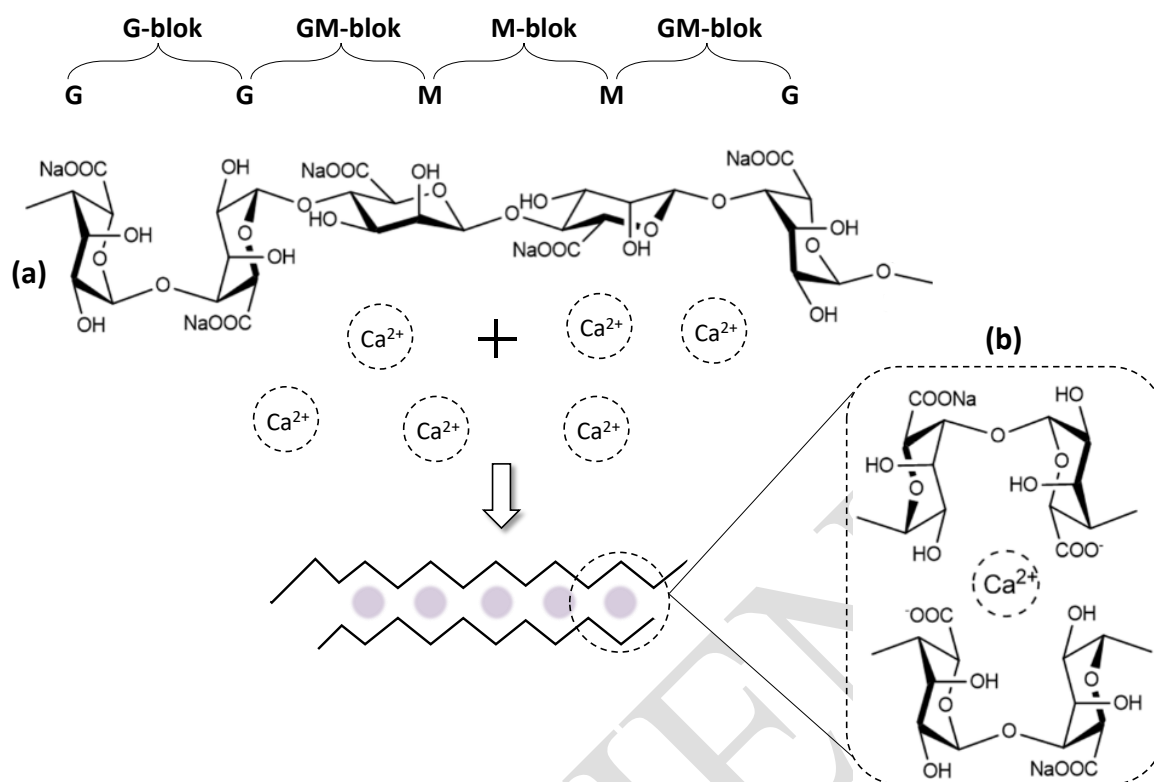
Morski eksudati

Morski eksudati su prirodni polisaharidni spojevi dobiveni iz algi, morskih trava i drugih mikroorganizama s raznolikim biološkim aktivnostima zbog čega imaju široku primjenu. U procesu inkapsulacije najčešće se koriste kao omotači, a među najpoznatijima su karagenani i alginati.

Karagenani su sulfatirani polisaharidi koji se izoliraju iz crvenih algi. Ovi spojevi posjeduju sposobnost stvaranja emulzija, a uz prisutnosti kationa, poput K^+ i Ca^{2+} , mogu formirati gelove (Mishra, 2016).

Alginati su linearni anionski polisaharidi sastavljeni od α -L-guluronske kiseline i β -D-manuronske kiseline, povezanih α -(1 $\rightarrow$ 4) vezom (Slika 2.17). Ovi polisaharidi su obilno prisutni u prirodi i proizvode se iz smeđih algi ili egzocelularnog materijala bakterija (Narsaiah i sur., 2014).

Funkcionalna svojstva alginata ovise o njihovoj strukturi, molekulskoj masi i sastavu. Najznačajnija karakteristika alginata je sposobnost stvaranja gela u prisustvu određenih kationa, pri čemu pokazuju specifičan afinitet prema vezivanju kationa kako slijedi : $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+}$. Ovi divalentni kationi vežu se za guluronske blokove alginatnih lanaca. Guluronski blokovi jednog polimera stvaraju veze sa susjednim polimernim lancima, pri čemu se stvara struktura poznata pod nazivom „egg box“ i rezultira stvaranjem gel strukture (Slika 2.17) (Castro i sur., 2021). Natrijev alginat često se koristi u inkapsulaciji zbog pogodnih svojstava poput netoksičnosti i kompatibilnosti s različitim aktivnim komponentama (Stojanovic i sur., 2012; Azevedo i sur., 2014). Također pruža dobru zaštitu za komponente osjetljive na pH, toplinu i kisik, što je iznimno važno tijekom skladištenja (Etchepare i sur., 2015).



Slika 2.17 Prikaz kemijske strukture natrijevog alginata (a) i „egg-box“ modela (b) nakon umrežavanja natrijevog alginata i divalentnih iona kalcija (prilagođeno prema Castro i sur. (2021))

2.6.1.2. Lipidi, masti i ulja, voskovi

Lipidi, uključujući mliječnu mast, njene frakcije poput oleina i stearina, te biljne masti i ulja poput sojinog ulja, ulja kanole, palminog ulja i suncokretovog ulja, predstavljaju korisne materijale za inkapsulaciju lipofilnih sastojaka hrane. Osim emulgacijskih svojstava, lipidi posjeduju jedinstvene karakteristike taljenja, površinske aktivnosti te djeluju kao učinkovite barijere protiv kisika i vode. Ova funkcionalna svojstva čine lipide poželjnim omotačima koji pridonose povećanoj stabilnosti i produljenju roka trajanja inkapsulata (Samborska i sur., 2021).

Voskovi, prirodni i sintetski, također su bitni za inkapsulaciju zbog svojih hidrofobnih i reoloških svojstava. Među prirodnim voskovima ističu se kandelila vosak (iz lišća grma *Candelilla*), karnauba vosak (iz lišća palme) i pčelinji vosak, dok se sintetski voskovi proizvode kemijskim putem iz petrokemijskih izvora i sastoje se uglavnom od visokomolekulskih ugljikovodika. Voskovi imaju nisku viskoznost pri taljenju, elastičnost, temperaturnu osjetljivost i mogućnost modulacije mehaničkih svojstava. Ove osobine omogućuju formiranje

zaštitne barijere i kontrolirano otpuštanje aktivnih tvari. Miješanjem različitih voskova ili dodatkom polimera, moguće je dodatno prilagoditi tvrdoću i krhkost omotača, što povećava njihovu primjenjivost u sustavima za inkapsulaciju (Balducci i sur., 2011).

2.6.1.3. Proteini

Proteini imaju široku primjenu u inkapsulaciji aktivnih tvari zbog niza prednosti koje ove makromolekule pružaju, uključujući biorazgradivost, biokompatibilnosti i visoku topljivost u vodi. Proteini se mogu ekstrahirati iz različitih izvora, bilo biljnih, poput proteina žitarica i uljarica, ili životinjskih, kao što su proteini sirutke i želatina. Uspoređujući ih sa životinjskim proteinima, biljni proteini često imaju prednost, posebno s obzirom na svoju manju alergičnost (Coimbra i sur., 2021). Mnogi biljni proteini pokazuju visoku sposobnost inkapsulacije hidrofilnih i hidrofobnih spojeva, što ih čini iznimno vrijednim u procesu inkapsulacije (Jia i sur., 2016).

Proteini soje su široko prepoznati kao nutritivno bogati, funkcionalni i povoljni za ljudsko zdravlje, zbog svoje izvrsne probavljivosti i niskog alergičnog potencijala. Uz povoljne učinke na zdravlje, sojini proteini imaju niz funkcionalnih svojstava koja ih čine prikladnima za inkapsulaciju. To uključuje visoku topljivost, izražena svojstva emulgiranja, sposobnost geliranja, kao i formiranje stabilnih filmova te apsorpcija vode i masti (Nesterenko i sur., 2013). Ovi proteini se često istražuju kao omotači u inkapsulaciji primjenom tehnika koacervacije te su popularni u inkapsulaciji sušenjem raspršivanjem, naročito kod inkapsulacije fitokemikalija (Comunian i Favaro-Trindade, 2016).

Proteini sirutke su važan nusproizvod u industriji sira, klasificirani kao GRAS i pristupačan izvor, a njihova široka primjena proizlazi iz bogatih nutritivnih i funkcionalnih svojstava (Comunian i Favaro-Trindade, 2016; Ramos i sur., 2019). Sastavljeni od β -laktoglobulina, α -laktalbumina, serumskog albumina i imunoglobulina, proteini sirutke imaju visoku topljivost u vodi i pokazuju svojstva emulgiranja i geliranja (McClements, 2014). Često se koriste u inkapsulaciji kao osnova za hidrogelove, nanočestice i složene koacervate u kombinaciji s različitim polisaharidima (Abae i sur., 2017; Ramos i sur., 2019).

Želatina, česti hidrokoloid primjenjivan u prehrambenoj industriji, proizvodi se djelomičnom kiselinskom ili lužnatom hidrolizom životinjskog kolagena, uglavnom iz kravlje kože, svinjske kože i kostiju, te riba, čime se postiže relativno visoka molekulska masa (15 000 – 400 000 Da). Stupanj hidrolize želatine varira ovisno o intenzitetu predobrade ili ekstrakcije toplom vodom,

dok podrijetlo kolagena, vrsta i dob životinja značajno utječu na njezine funkcionalne karakteristike. Proces cijepanja vodikovih veza i kovalentnih veza kolagena destabilizira njegovu konfiguraciju, što rezultira prijelazom strukture iz spirale u zavojnicu, stvarajući topljivu želatinu (McClements, 2014; Comunian i Favaro-Trindade, 2016; Ali i sur., 2019). Prednosti želatine uključuju visoku dostupnost i nisku cijenu, a njezina topljivost i biokompatibilnost s različitim bioaktivnim spojevima dodatno proširuju njezinu primjenu (Ali i sur., 2019). Funkcionalna svojstva želatine, poput sposobnosti stvaranja gela, formiranja filma, visoke stabilizirajuće aktivnosti i sposobnosti stvaranja fine, guste mreže, čine izuzetno atraktivnom za industrijsku primjenu, posebno u postupcima inkapsulacije metodama sušenja raspršivanjem i emulgiranjem.

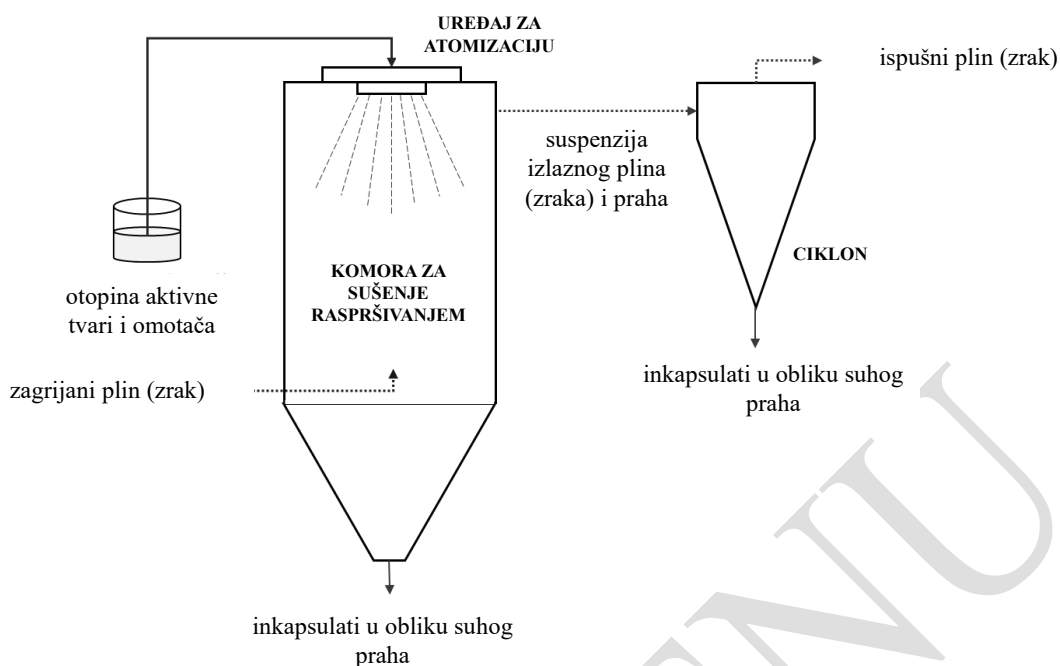
2.6.2. Metode inkapsulacije

Metode koje se primjenjuju za inkapsulaciju obuhvaćaju različite tehnike koje omogućuju učinkovitu zaštitu aktivnih tvari, a mogu se podijeliti u tri osnovne skupine: fizikalne, kemijske i fizikalno-kemijske metode (Tolun i sur., 2016; Ozkan i sur., 2019). Fizikalne metode, poput sušenja raspršivanjem, sušenja hlađenjem, sušenja zamrzavanjem, te ekstruzije, često se ističu svojom praktičnošću i učinkovitošću u inkapsulaciji. S druge strane, kemijske metode, poput molekularne inkluzije i polimerizacije, imaju posebne prednosti u specifičnim primjenama kao što su inkapsulacija aroma i osjetljivih spojeva. Fizikalno-kemijske metode, kao što su koacervacija, upotreba liposoma i ionsko geliranje, kombiniraju karakteristike oba pristupa.

U slijedećim odlomcima opisane su metode korištene za inkapsulaciju ekstrakata tropa grožđa u ovom doktorskom radu.

2.6.2.1. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem trenutno je najraširenija metoda inkapsulacije (Ribeiro i sur., 2019). Prema Ozkan i sur. (2019) budući da se ističe se kao tehnološki pristupačna, jednostavna, fleksibilna i brza metoda inkapsulacije visokog kapaciteta. Princip metode temelji se na raspršivanju otopine ili emulzije koja sadrži aktivnu tvar i otopljeni omotač pomoću mlaznica u komoru ispunjenu zagrijanim plinom (zrakom). Prilikom raspršivanja, dolazi do isparavanja otapala zbog visokih temperatura i velikog odnosa površine i volumena kapljica. Time se formiraju suhe čestice u obliku praha, koje se zatim odvajaju od plina (zraka) u ciklonu (**Slika 2.18**).



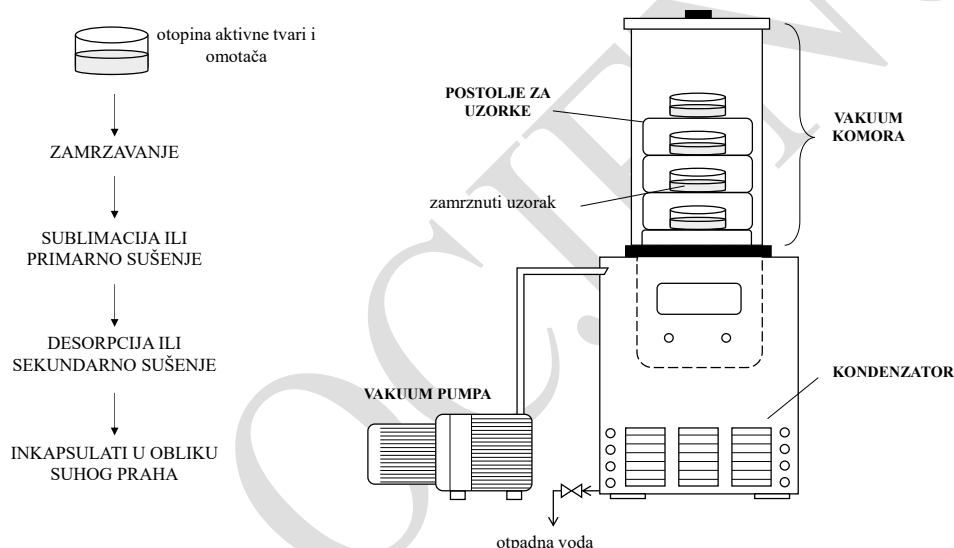
Slika 2.18 Shema metode inkapsulacije protustrujnim sušenjem raspršivanjem (prilagođeno prema Grgić i sur. (2020))

Učinkovitost i svojstva dobivenih inkapsulata ovise o procesnim parametrima kao što su temperatura sušenja, brzina protoka zraka, protok pojne otopine, vrsta i koncentracija omotača. Među glavnim prednostima metode ističu se: brzina procesa, prikladnost za kontinuiranu industrijsku proizvodnju, mogućnost dobivanja suhih proizvoda s niskim udjelom vlage, s povećanom mikrobiološkom stabilnosti, lakše skladištenje i transport proizvoda, te s obzirom na industrijsku primjenjivost relativno povoljna cijena u odnosu na druge metode inkapsulacije i sušenja poput liofilizacije i superkritičnog sušenja (Labuschagne, 2018; Ribeiro i sur., 2019). Ova metoda je pogodna za očuvanje visokovrijednih bioaktivnih spojeva kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, antocijani i vitamini, zahvaljujući kratkom vremenu zadržavanja u komori i brzom uklanjanju otapala (Dadi i sur., 2020; Righi Da Rosa i sur., 2021).

Unatoč navedenim prednostima, metoda sušenja raspršivanjem ima i ograničenja koja mogu negativno utjecati na homogenost inkapsulata i kvalitetu konačnog proizvoda, poput neujednačene veličine i oblika čestica te primjene uglavnom na omotače topljive u vodi (iako je moguće koristiti i druga otapala uz odgovarajuću prilagodbu opreme) (Labuschagne, 2018; Ribeiro i sur., 2019).

2.6.2.2. Sušenje zamrzavanjem

Sušenje zamrzavanjem predstavlja postupak sušenja koji se primjenjuje na toplinski osjetljive i nestabilne spojeve, poput aroma i mikroorganizama (Yamashita i sur., 2017), pri čemu se zadržavaju izvorna funkcionalna svojstva inkapsuliranih spojeva (Ballesteros i sur., 2017). Ovom metodom, otopina omotača i aktivne tvari se zamrzava kako bi se formirali kristali leda, koji se zatim sublimiraju u vakuumskim komorama. Preostala voda uklanja se putem desorpcije, poznata i kao sekundarno sušenje. Proces sublimacije ledenih kristala rezultira stvaranjem porozne strukture koja doprinosi izvrsnim rehidracijskim svojstvima dobivenog praškastog proizvoda (**Slika 2.19**) (Fang i Bhandari, 2010).



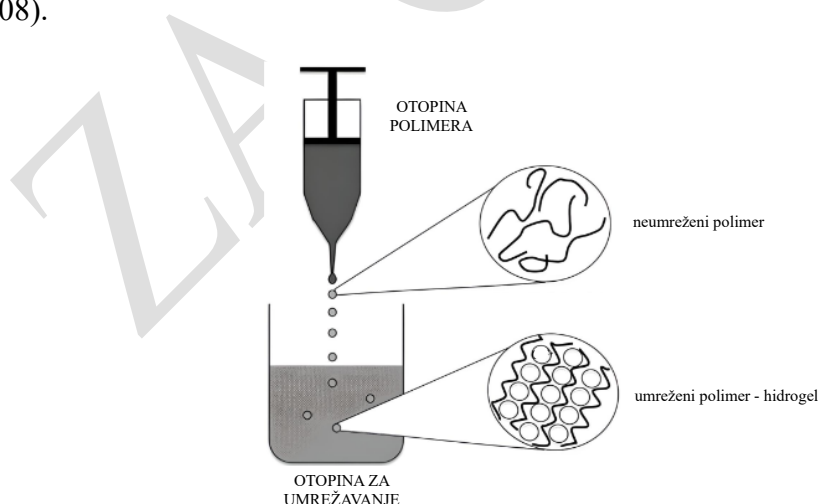
Slika 2.19 Shema inkapsulacije metodom sušenja zamrzavanjem i liofilizatora (prilagođeno prema Taskin (2020))

Među prednostima ove metode ističe se stvaranje proizvoda izvrsne kvalitete, što proizlazi iz upotrebe niskih temperatura, odsutnosti zraka i tekuće vode. Sušenje zamrzavanjem također minimizira ili u potpunosti sprječava kvarenje proizvoda uzrokovanih mikrobnim, oksidacijskim i drugim kemijskim reakcijama (Labuschagne, 2018). Nedostatak ove metode inkapsulacije su visoki troškovi rada koji mogu biti i do 50 puta veći u usporedbi s procesom sušenja raspršivanjem te dugotrajnost procesa koje može premašiti i 20 sati (Labuschagne, 2018; Ozkan i sur., 2019).

2.6.2.3. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje predstavlja fizikalno-kemijsku metodu inkapsulacije koja se temelji na interakcijama između polimera i viševalentnih iona, a može se provoditi metodom ekstruzije ili metodom emulgiranja (Yeo i sur., 2001).

Metodom ekstruzije vodena otopina ionskih polimera (gume, alginati, pektin, kitozan, itd.) ekstrudira se kap po kap u vodenu otopinu suprotnih protukationa (za anionske polisaharide) ili protuaniona (za kationske polisaharide) (Patil i sur., 2010; Nayak i Pal, 2015; Pal i Nayak, 2017). Elektrostatske interakcije između suprotno nabijenih iona i ionskih polimera potiču ionsko geliranje, odnosno njihovo umrežavanje što rezultira stvaranjem polimernih čestica – hidrogelova (Paques i sur., 2014). Ova metoda je relativno jednostavna, koriste se blagi uvjeti reakcije, što znači da reakcija između iona i polimera ne zahtjeva ekstremne temperature, visok tlak ili upotrebu agresivnih kemikalija, a fizičko umrežavanje putem ionskog geliranja izbjegava upotrebu toksičnih reagensa čime se smanjuje rizik od nepoželjnih učinaka ili opasnosti po zdravlje. Ključni faktori koji utječu na metodu ionskog geliranja uključuju vrstu polimera i viševalentnih iona za umrežavanje, pH vrijednost, koncentraciju, vrijeme i temperaturu reakcije (Racovića i sur., 2009; Patil i sur., 2010). Najjednostavnija metoda ekstruzije uključuje primjenu šprice (**Slika 2.20**). Međutim, glavni nedostatak ove metode je ograničenost na laboratorijske uvjete budući da često dolazi do problema s potiskivanjem viskoznijih otopina polimera i aktivne tvari kroz igle manjeg promjera što rezultira začepljenjem igle i nemogućnošću dobivanja hidrogelova manjih dimenzija (Prüsse i sur., 2008).



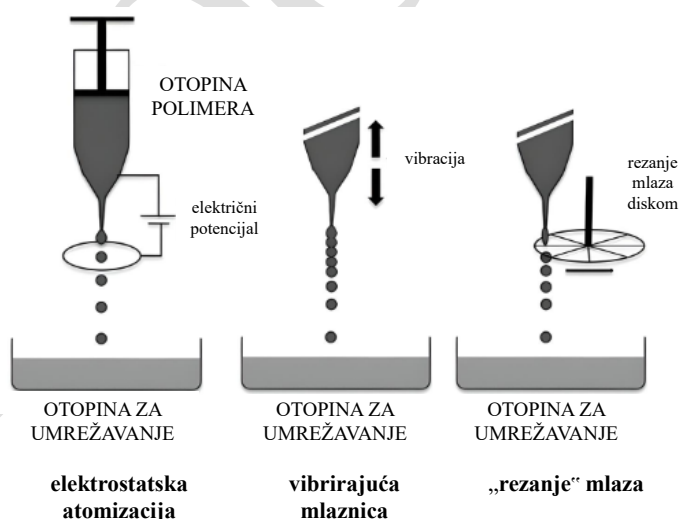
Slika 2.20 Shema ionskog geliranja metodom jednostavne ekstruzije (prilagođeno prema Ching i sur. (2017))

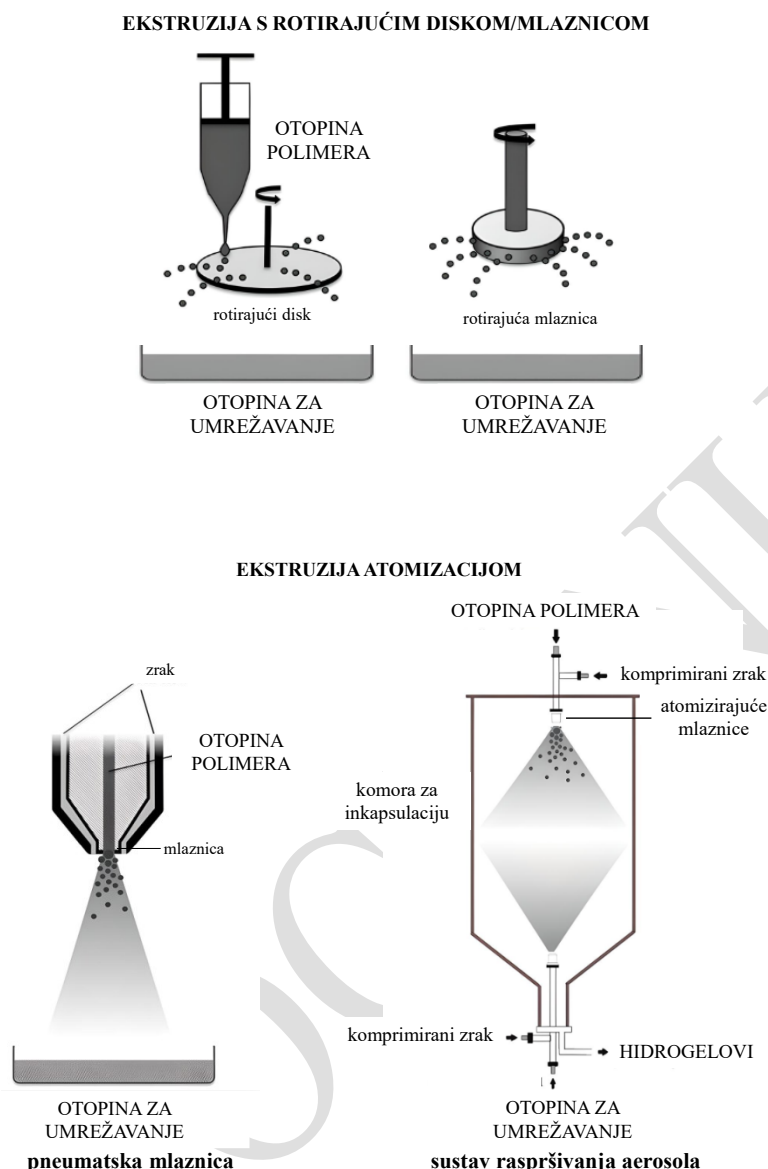
Iz tog razloga, razvijeno je nekoliko modificiranih metoda ekstruzije kako bi se prevladali ovi nedostaci jednostavne metode ekstruzije i proizveli ujednačeni hidrogelovi manjih veličina (Slika 2.21). Ovisno o načinu formiranja kapljice polimera, metode ionskog geliranja mogu se podijeliti u tri glavne kategorije. U svim metodama, kapljice polimera formiraju se prije kontakta s otopinom za umrežavanje, gdje dolazi do njihovog geliranja u hidrogelove:

ekstruzija razbijanjem mlaza (*jet breakup*) – kapljice se formiraju razbijanjem laminarnog mlaza polimerne otopine ekstruzijom kroz vrh mlaznice, a mlaz se zatim razbija elektrostatskom atomizacijom (Watanabe i sur., 2003), vibrirajućom mlaznicom (Gotoh i sur., 1991) ili „rezanjem“ mlaza (Senuma i sur., 2000);

- ekstruzija s rotirajućim diskom/mlaznicom – stvaranje kapljica postiže se djelovanjem centrifugalne sile na polimernu otopinu koja protječe preko rotirajuće površine poput diska ili mlaznice (Ogbonna i sur., 1989);
- ekstruzija atomizacijom – kapljice se proizvode istodobnim pumpanjem zraka i otopine polimera pri velikim brzinama protoka u mlaznicu, a u trenutku kada kapljice dođu u kontakt s otopinom za umrežavanje, dolazi do stvaranja hidrogelova (Ching i sur., 2017).

EKSTRUZIJA RAZBIJANJEM MLAZA



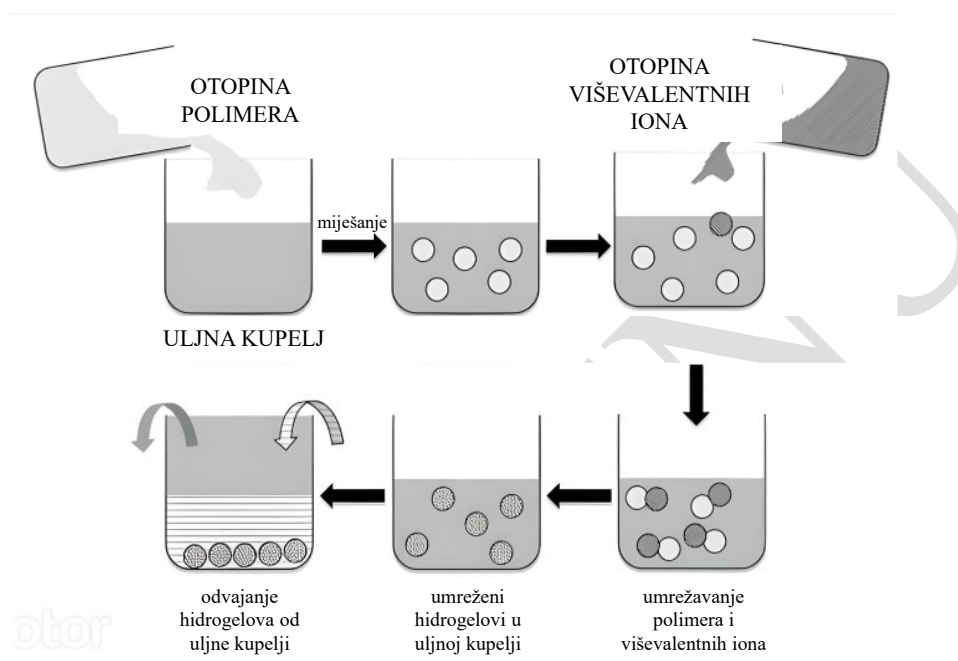


Slika 2.21 Shema ionskog geliranja modificiranim metodama ekstruzije (prilagođeno prema Ching i sur. (2017))

Metoda emulgiranja uključuje raspršivanje vodene otopine polimera i aktivne tvari u nevodenoj fazi – uljnoj kupelji, i homogenizaciju radi formiranja emulzije „vode u ulju“. Nakon toga, polako se dodaje otopina viševalentnih iona u emulziju uz miješanje što dovodi do umrežavanja i stvaranja hidrogelova (**Slika 2.22**). Veličina čestica dobivenih ovom metodom varira u rasponu od 0,2 – 1000 μm (Chan i sur., 2000; Poncelet, 2001; Zhang i sur., 2006), a faktori poput vrste i koncentracije emulgatora, omjera ulja i polimera te snaga homogenizacije utječu na distribuciju veličine i promjer hidrogelova (Reis i sur., 2006). Prednost ove metode je njezina

ekonomičnost, a glavni nedostatak nasumično spajanje kapljica, što često rezultira neujednačenim hidrogelovima po veličini i obliku (Fundueanu i sur., 1999; Zhao i sur., 2007).

METODA EMULGIRANJA



Slika 2.22 Shema ionskog geliranja metodom emulgiranja (prilagođeno prema Ching i sur., 2017))

Općenito, stvaranje hidrogelova može se provoditi vanjskim ili unutarnjim geliranjem. Ove metode se razlikuju po načinu na koji se viševalentni ioni za umrežavanje dovode u kontakt s polimerom. Primjerice, u vanjskom ionskom geliranju, ioni difundiraju iz vanjskog izvora (poput otopine kalcijeva klorida) u otopinu polimera (Davarcı i sur., 2017). S druge strane, kada se otopina sredstva za umrežavanje dodaje u otopinu omotača (polimera) i aktivne tvari radi se o unutarnjem ionskom geliranju, što rezultira proizvodnjom hidrogelova s vodenom jezgrom. Vanjsko ionsko geliranje rezultira proizvodnjom hidrogelova s glatkom površinom, većom čvrstoćom i boljom propusnošću od onih proizvedenih unutarnjim ionskim geliranjem (Draget i Taylor, 2011).

2.7. MATEMATIČKO MODELIRANJE KINETIKE OTPUŠTANJA AKTIVNE TVARI IZ INKASPULATA

Otpuštanje aktivnih sastojaka iz matriksa tijekom probave ključno je za mogućnost njihove apsorpcije u ljudskom organizmu. Matematičko modeliranje omogućuje opisivanje kinetike otpuštanja aktivne tvari putem matematičkih jednažbi (Bruschi, 2015). Ovi su modeli izvorno razvijeni za farmaceutske formulacije, s ciljem razumijevanja i optimizacije oslobađanja lijekova *in vitro* i *in vivo*, te postizanja kontroliranog otpuštanja (Peppas i Narasimhan, 2014). U novije vrijeme, matematičko modeliranje sve se više primjenjuje i u prehrambenim formulacijama, osobito kod procjene kinetike otpuštanja bioaktivnih sastojaka iz funkcionalnih i inkapsuliranih sustava. Iako postoji nekoliko mehanizama koji mogu utjecati na kontrolirano otpuštanje, tri glavna mehanizma uključena u otpuštanje bioaktivnih spojeva iz inkapsulata su: difuzija, razgradnja ili erozija te bubrenje (Leong i Langer, 1988).

Difuzija je prevladavajući mehanizam u procesu otpuštanja aktivne tvari iz inkapsulata. Ovaj proces proizlazi iz razlike u koncentraciji aktivne tvari unutar inkapsulata i izvan njega, što potiče difuziju aktivne tvari s područja visoke koncentracije prema području niže koncentracije (Ko i Gunasekaran, 2014). Tijekom difuzije, inkapsulirana čestica može zadržati svoju strukturu ili podleći promjenama kao što su bubrenje, skupljanje, fragmentacija ili erozija.

Brojni faktori utječu na brzinu otpuštanja inkapsuliranih bioaktivnih spojeva, uključujući karakteristike spoja (poput polariteta i molekularne mase), svojstva omotača (fizikalno-kemijska svojstva, interakcije s aktivnim spojem, polaritet, reološka svojstva), te svojstva inkapsulata (parametri oblika i veličine te struktura). Osim toga, brzina protoka okolne tekućine i gradijent koncentracije bioaktivnih tvari između omotača i okolne tekućine ili plina također mogu značajno utjecati na dinamiku otpuštanja (McClements, 2017).

Razgradnja ili erozija često se promatra kroz različite mehanizme degradacije, uključujući enzimsku, kemijsku i, u nekim slučajevima, mikrobnu biorazgradnju. Kada se polimeri razgrađuju, aktivni spojevi unutar polimera se otpuštaju (Ko i Gunasekaran, 2014). U jednoj skupini biorazgradivih materijala, površina inkapsulata se smanjuje tijekom vremena, što rezultira smanjenjem otpuštanja aktivne tvari. U drugoj skupini, inkapsulat se prvo postupno razgrađuje, a zatim dolazi do ubrzanog otpuštanja aktivne tvari zbog fenomena autokatalize (Ko i Gunasekaran, 2014).

Erozija predstavlja mehanizam u kojem se oslobađanje bioaktivnih sastojaka može dogoditi bez njihovog transporta (Jafari, 2020). Ovaj mehanizam otpuštanja može biti potaknut različitim

čimbenicima, uključujući visoku temperaturu, utjecaj jakih kiselina ili baza te enzimsku aktivnost. Postoje dvije osnovne vrste erozije: masovna erozija (*bulk*) – gdje se razgradnja događa kroz cijelu česticu, i površinska erozija – gdje se degradacija odvija samo na površini čestice (McClements, 2014). Profil otpuštanja kontrolira brzina erozije, pri čemu svojstva inkapsulata i okolišni čimbenici odgovorni za eroziju, kao i vrsta erozije (površinska ili masovna), imaju značajan utjecaj.

Bubrenje inkapsulata nastaje kao posljedica apsorpcije otapala. Brzina otpuštanja bioaktivnih tvari može se odrediti brzinom bubrenja i vremenom potrebnim da bioaktivna tvar difundira kroz nabubreni sustav (McClements, 2014). Prisutnost bilo kojeg sastojka koji djeluje kao osmolit može utjecati na bubrenje inkapsulata, što rezultira prodiranjem otapala u inkapsulirani sustav. Ovaj mehanizam otpuštanja može se kontrolirati odgovarajućim odabirom polimera, odnosno omotača, kao i regulacijom uvjeta okoline poput temperature i pH vrijednosti okolne otopine (Jafari, 2020).

U inkapsulatima za čiju su pripremu korišteni prirodni biorazgradivi omotači, dominantni mehanizam otpuštanja inkapsulirane aktivne tvari je difuzija, ali uz bubrenje i eroziju. Difuzija se odnosi na proces prijenosa aktivne tvari kroz mrežu omotača, bubrenje na povećanje volumena omotača uslijed apsorpcije otapala, dok erozija uključuje fizičku ili kemijsku degradaciju omotača. Temeljem ove kategorizacije često se razvijaju matematički modeli koji opisuju otpuštanje aktivne tvari iz inkapsulata.

Primjena matematičkog modeliranja ima za cilj razumijevanje prijenosa mase i kemijskih reakcija u specifičnim sustavima, uključujući inkapsulate (Lokhandwala i sur., 2013). Korištenjem prikladnih matematičkih modela moguće je predvidjeti utjecaj fizikalno-kemijskih parametara inkapsulata (poput dimenzija, geometrije i teksture) te učinkovitost inkapsulacije na mehanizam otpuštanja aktivne tvari. Ovo smanjuje potrebu za brojnim eksperimentima, što rezultira ekonomskim i energetske uštedama (Siepmann i Peppas, 2012; Peppas i Narasimhan, 2014). Podaci o kinetici otpuštanja aktivne tvari iz inkapsulata važni su za istraživanje potencijalne primjene inkapsuliranih čestica u prehrambenim sustavima (Assadpour i sur., 2017). Primjerice, ako je otpuštanje sporo, inkapsulati se mogu koristiti u proizvodnji funkcionalne hrane i hrane s dodanom vrijednošću. S druge strane, visoke brzine otpuštanja aktivnih tvari iz inkapsuliranih čestica povećavaju njihovu izloženost okolnim utjecajima i smanjuju njihovu zaštitu (Robert i sur., 2012).

U sljedećim potpoglavljima su opisani matematički modeli korišteni u izradi doktorskog rada za opisivanje otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz inkapsulata: model prvog reda, Higuchi model, Hixson-Crowell model i Korsmeyer-Peppas model. Većina matematičkih modela otpuštanja temelji se, u potpunosti ili djelomično, na Fickovom zakonu difuzije, koji opisuje transport tvari uslijed koncentracijskog gradijenta. Iako neki modeli, poput Higuchi modela, izravno proizlaze iz Fickove difuzijske jednačbe, drugi kao što su model prvog reda, Hixson-Crowell i Korsmeyer-Peppas uključuju dodatne kinetičke ili empirijske elemente koji proširuju primjenjivost modela na sustave u kojima otpuštanje ovisi i o drugim mehanizmima, poput razgradnje, promjene površine čestice ili bubrenja.

Ispitani modeli u ovom radu temelje se na Fickovom zakonu difuzije, koji je temelj raznih empirijskih i teorijskih matematičkih modela za opisivanje otpuštanja aktivnih tvari iz sustava poput lijekova ili inkapsulata.

2.7.1. Fickov zakon difuzije

Budući da je Fickov zakon difuzije temelj za razumijevanje mehanizma otpuštanja u nekoliko primijenjenih matematičkih modela, u nastavku je prikazano njegovo značenje na primjeru inkapsulata u kojima je inkapsulirana aktivna tvar.

Inkapsulat se otapa u određenom otapalu poput vode, krvi ili probavnim tekućinama. Međutim, otopljene molekule aktivne tvari ne raspoređuju se ravnomjerno u cijelom otapalu koje se naziva „tekućina u rasutom stanju“ (*bulk liquid*), već se na površini inkapsulata stvara sloj koji se naziva „ustajala tekućina“ (*stagnant liquid*). Kada se analizira difuzija aktivne tvari, pretpostavlja se da je koncentracija molekula aktivne tvari na površini nula, što olakšava izračunavanje procesa difuzije. Ova pretpostavka se temelji na konstantnoj difuziji i gradijentu koncentracije. Prema Fickovom zakonu difuzije, molekule aktivne tvari se kreću od područja veće koncentracije prema području manje koncentracije kroz ustajalu tekućinu (Fick, 1855), a opisuje se izrazom (2.1):

$$J = -D_f \cdot \frac{dc}{dx} \quad (2.1)$$

gdje je J – količina tvari koja prolazi kroz jedinicu površine u jedinici vremena (tzv. fluks), D_f – koeficijent difuzije, a $\frac{dc}{dx}$ – koncentracijski gradijent. Negativni predznak u jednadžbi predstavlja smjer difuzije iz područja veće prema području manje koncentracije tvari.

2.7.2. Model prvog reda

Model prvog reda temelji se na Fickovom zakonu difuzije i dodatno pretpostavlja da je brzina otpuštanja proporcionalna koncentraciji aktivne tvari u inkapsulatu što se može izraziti jednadžbom (2.2):

$$R = k_1 \cdot C \quad (2.2)$$

gdje je R – brzina reakcije, k_1 – konstanta brzine otpuštanja prvog reda, a C – koncentracija aktivne tvari koja ulazi u reakciju. Također, brzina reakcije može se napisati i kao promjena koncentracije tvari C u nekom vremenu t (2.3).

$$R = -\frac{\Delta C}{\Delta t} \quad (2.3)$$

Brzina reakcije može se također opisati i u obliku diferencijalne jednadžbe (2.4):

$$\frac{dC}{dt} = -k_1 \cdot C \quad (2.4)$$

Kako bi se riješila ova diferencijalna jednadžba (2.4), potrebno je zadati početni uvjet C_0 , odnosno početnu koncentraciju aktivne tvari. S obzirom na to, rješenje je izraz (2.5):

$$\int_{C_0}^C \frac{1}{C} dC = -k_1 \int dt \quad \longrightarrow \quad \ln(C) \Big|_{C_0}^C = -k_1 \cdot t$$

$$\ln(C) - \ln(C_0) = -k_1 \cdot t \quad \longrightarrow \quad \ln(C) = \ln(C_0) - k_1 \cdot t$$

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (2.5)$$

gdje su $C(t)$ – koncentracija otpuštene aktivne tvari u otapalu u vremenu t , C_0 – početna koncentracija otpuštene aktivne tvari u otapalu i k_1 – konstanta brzine otpuštanja prvog reda. Nadalje, logaritmiranje izraza (2.5) je korak koji se koristi za dobivanje izraza (2.6) koji olakšava analitičku obradu podataka (Elmas i sur., 2020).

$$\log(C) = \log(C_0) - \frac{k_1 \cdot t}{2,303} \quad (2.6)$$

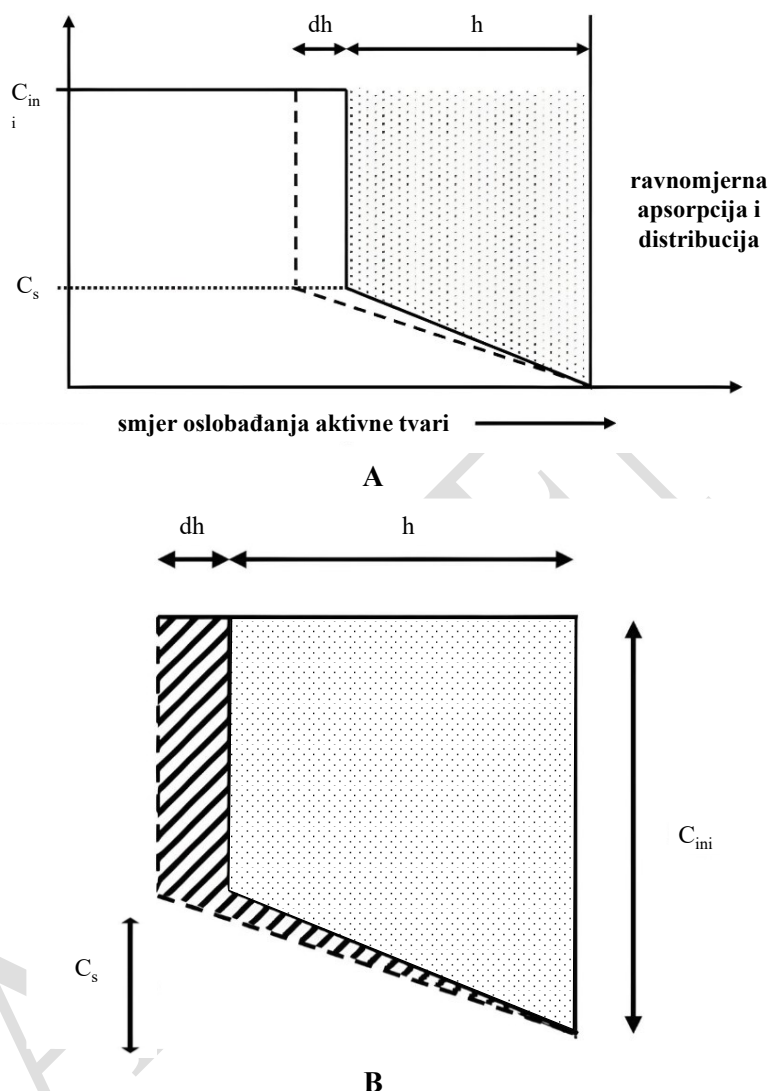
Tijekom procesa otpuštanja, koncentracija aktivne tvari unutar inkapsulirane čestice opada. Pretpostavljiva se da je takvo otpuštanje linearno, što može rezultirati razlikama između eksperimentalnih podataka i modelom predviđenih krivulja otpuštanja (Manca i Rovaglio, 2003). Modelom prvog reda često se opisuje kinetika otpuštanja aktivnih tvari koje su topive u vodi i inkapsulirane u poroznim inkapsulatima ili pak tvari topive u ulju i/ili vodi pripremljene metodom emulgiranja (Costa i Sousa Lobo, 2001a).

2.7.3. Higuchi model

Prije pola stoljeća, profesor Takeru Higuchi formirao je svoju poznatu jednadžbu koja omogućuje predviđanje oslobađanja lijeka iz tankih slojeva masti (Higuchi, 1962). Prije primjene iste, analizirao je određene pretpostavke kako bi se prevladali potencijalni problemi. Ove pretpostavke je bitno uzeti u obzir prilikom uporabe Higuchi modela kako bi se izbjegla mogućnost zloupotrebe modela, a uključuju sljedeće (Siepmann i Peppas, 2012; Malekjani i Jafari, 2021):

- matriks sadrži početnu koncentraciju aktivne tvari veću od topljivosti aktivne tvari,
- debljina matriksa veća je od veličine molekula aktivne tvari,

- difuzija je jednosmjerna i konstantna,
- bubrenje i otapanje matriksa je zanemarivo i
- postiže se ravnomjerna apsorpcija i distribucija.



Slika 2.23 (A) Shematski prikaz koncentracije lijeka i profila udaljenosti unutar masti nakon izlaganja uvjetima ravnomjerne apsorpcije i distribucije u vremenu t (puna linija) i u vremenu $t + dt$ (isprekidana linija) te (B) površine koje označavaju količine lijeka otpuštene iz masti u vremenu t (točkasti trapez) i u vremenu $t + dt$ (isprekidani trapez + točkasti trapez). Varijable imaju sljedeća značenja: C_{ini} – početna koncentracija lijeka, C_s – topljivost lijeka, h – udaljenost prednje strane, koja dijeli mast bez neotopljenog viška lijeka od masti koja još uvijek sadrži neotopljeni višak lijeka, od sučelja "mast-koža" u vremenu t , dh je udaljenost koju ova fronta pomiče prema unutra tijekom vremenskog intervala dt (prilagođeno prema Siepmann i Peppas, 2011)

Površina isprekidanog trapeza na **Slici 2.23 B** odgovara kumulativnoj količini oslobođenog lijeka podijeljenoj s površinom sloja masti koji je izložen koži, A . Zbog vrlo jednostavne

geometrije, lako se može pokazati da je kumulativna količina lijeka oslobođena iz filma masti u vremenu $t - M_t$ te se može izračunati na sljedeći način (2.7):

$$\frac{M_t}{A} = h \left(C_{ini} - \frac{C_s}{2} \right) \quad (2.7)$$

Međutim, za korištenje ove jednadžbe h mora biti poznat, ali može se izraziti kao funkcija drugih varijabli te se dobije izraz (2.8):

$$\frac{dM}{A} = C_{ini} dh - \frac{C_s}{2} dh \quad (2.8)$$

Osim toga, Fickov zakon difuzije (Patzek, 2014) može se koristiti za kvantificiranje količine lijeka otpuštenog iz filma masti u vremenskom intervalu dt :

$$\frac{dM}{dt} = AD \frac{C_s}{h} \quad (2.9)$$

gdje je D – konstanta difuzije. Kombinirajući izraze (2.8) i (2.9) dobije se sljedeći izraz za h :

$$h = 2 \sqrt{\frac{D \cdot t \cdot C_s}{2 \cdot C_{ini} - C_s}} \quad (2.10)$$

Zamjenom jednadžbe (2.10) u jednadžbu (2.7) i pojednostavljenje dovodi do izraza (2.11):

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{(2C_{ini} - C_s) \cdot D \cdot t \cdot C_s} \quad (2.11)$$

Prema Higuchiju početna koncentracija lijeka znatno je veća od njegove topljivosti i vrijedi $C_{ini} \gg C_s$, stoga se jednažba (2.11) može dalje pojednostaviti te se dobije klasični oblik Higucijeve jednažbe (2.12):

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{2 \cdot C_{ini} \cdot D \cdot C_s \cdot t} \quad (2.12)$$

ili često korišteni generalni oblik (2.13):

$$M_t = k_H \sqrt{t} \quad (2.13)$$

gdje je k_H – Higucijeva konstanta otapanja:

$$k_H = A \sqrt{2 \cdot C_{ini} \cdot D \cdot C_s} \quad (2.14)$$

Klasična Higucijeva jednažba uobičajeno se koristila za opisivanje otpuštanja aktivnih tvari iz planarnih sustava poput filmova ili flastera, a kasnije je proširena i na druge geometrije (Higuchi, 1963; Siepmann i Peppas, 2011).

2.7.4. Hixson-Crowell model

Hixson-Crowellov model još je jedan matematički model koji se često koristi u ovom području (Hixson i Crowell, 1931). Ovaj model koristi koncept brzine promjene mase čestice s vremenom što se može sažeti kao izraz (2.15):

$$\frac{dw}{dt} = kS(C_s - C) \quad (2.15)$$

gdje je $\frac{dw}{dt}$ – brzina promjene mase čestice s vremenom, k – konstanta brzine, S – početna površina čestice, C_s – koncentracija zasićene otopine, a C – koncentracija aktivne tvari u

otopini. Ova jednadžba koristi se za opisivanje kako se masa aktivne tvari u česticama smanjuje s vremenom zbog oslobađanja aktivne tvari u otopinu.

Ako se masa čestice otopi u trenutku t **(2.16)**:

$$w_0 - w \quad (2.16)$$

tada je masa u određenom volumenu **(2.17)**:

$$\frac{w_0 - w}{V} = C \quad (2.17)$$

gdje je w_0 – početna masa čestice ($t = 0$), w – masa čestice u vremenu t , a V – volumen otopine. Ako je $C = 0$ kada je $t = 0$, onda vrijedi izraz **(2.18)**:

$$\frac{w_s}{V} = C_s \quad (2.18)$$

gdje je w_s – masa čestice potrebna za zasićenje tekućine pod danim uvjetima (npr. temperature, volumena...) na početku. Zamjenom izraza **(2.17)** i **(2.18)** u jednadžbu **(2.15)** dobije se izraz **(2.19)**:

$$\frac{dw}{dt} = -kS \left(\frac{w_s}{V} - \frac{w_0 - w}{V} \right) \longrightarrow V \left(\frac{dw}{dt} \right) = -kS(w_s - w_0 + w) \quad (2.19)$$

Pod pretpostavkom da nema promjene u obliku čestice dok se otapa, ali da njena površina (S) varira kao dvotrećinska potencija njenog volumena (V):

$$S = V^{2/3}, \quad V = \frac{w}{d} \longrightarrow S = \frac{1}{d^{2/3}} \cdot w^{2/3} \quad (2.20)$$

gdje je d – gustoća čestice, a $\frac{1}{d^{2/3}}$ predstavlja konstantu k_s . Zamjenom površine (S) u jednadžbu **(2.19)**, definiranjem izraza $w_s - w_0$ kao g te kombiniranjem konstanti (K_1) dobije se izraz **(2.21)**:

$$V \left(\frac{dw}{dt} \right) = -k \cdot k_s w^{2/3} (w_s - w_0 + w) \longrightarrow V \left(\frac{dw}{dt} \right) = -k \cdot k_s w^{2/3} (g + w)$$

$$V \left(\frac{dw}{dt} \right) = -K_1 \cdot w^{2/3} (g + w) \quad (2.21)$$

Daljnjim rješavanjem i integriranjem jednadžbe (2.21) dolazi se do izraza (2.22) koji se smatra Hixson-Crowell modelom:

$$w_0^{1/3} - w_t^{1/3} = k_{HC} \cdot t \quad (2.22)$$

gdje w_0 označava početnu količinu aktivne tvari u inkapsulatu, w_t je preostala količina aktivne tvari u inkapsulatu u trenutku t , a k_{HC} je Hixson-Crowell konstanta proporcionalnosti (Hixson i Crowell, 1931; Elmas i sur., 2020).

2.7.5. Korsmeyer-Peppas model

Korsmeyer i suradnici (1983) izveli su jednostavan odnos koji opisuje oslobađanje aktivne tvari iz jednadžbe polimernog sustava (2.23):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n \quad (2.23)$$

gdje je M_t količina aktivne tvari koja je otpuštena u vremenu t , M_∞ je ukupna količina aktivne tvari dostupna za otpuštanje, k_{KP} je konstanta brzine otpuštanja, a n je eksponent otpuštanja koji odražava mehanizam otpuštanja i daje informacije o geometriji čestice iz koje se otpušta aktivna tvar (Tablica 2.1). Zbog složenosti modela, izvod jednadžbe (2.23) nije prikazan, no Elmas i sur. (2020) su ga detaljno prikazali i objasnili.

Tablica 2.1 Vrijednost eksponenta otpuštanja (n) Korsmeyer–Peppasovog modela za različite geometrije

Geometrija čestica	Eksponent otpuštanja, n	Mehanizam otpuštanja
film	0,5	Fickova difuzija
cilindar	0,45	
sfera	0,43	
film	$0,5 < n < 1,0$	ne-Fickov transport
cilindar	$0,45 < n < 0,89$	
sfera	$0,43 < n < 0,85$	
film	1,0	Transport slučaja II
cilindar	0,89	
sfera	0,85	
film	$n > 1,0$	Transport superslučaja II
cilindar	$n > 0,89$	
sfera	$n > 0,85$	

Kada se promatra vrijednost eksponenta n , razlikuju se četiri mehanizma transporta aktivne tvari iz čestice. Ukratko, u slučaju vrijednosti n do 0,5 označavaju Fickovu difuziju te n 0,5 – 1,0 anomalan odnosno ne-Fickov transport koji uključuje difuziju i bubrenje. Nadalje, ukoliko je vrijednost $n = 1$ radi se o transportu slučaja II (*Case II transport*) koji je određen kinetikom modela nultog reda, a vrijednosti $n > 1$ odražavaju takozvani transport superslučaja II (*Super Case II transport*) što predstavlja ekstremnu vrstu prijenosa aktivne tvari (Bruschi, 2015).

ZA OČIENU

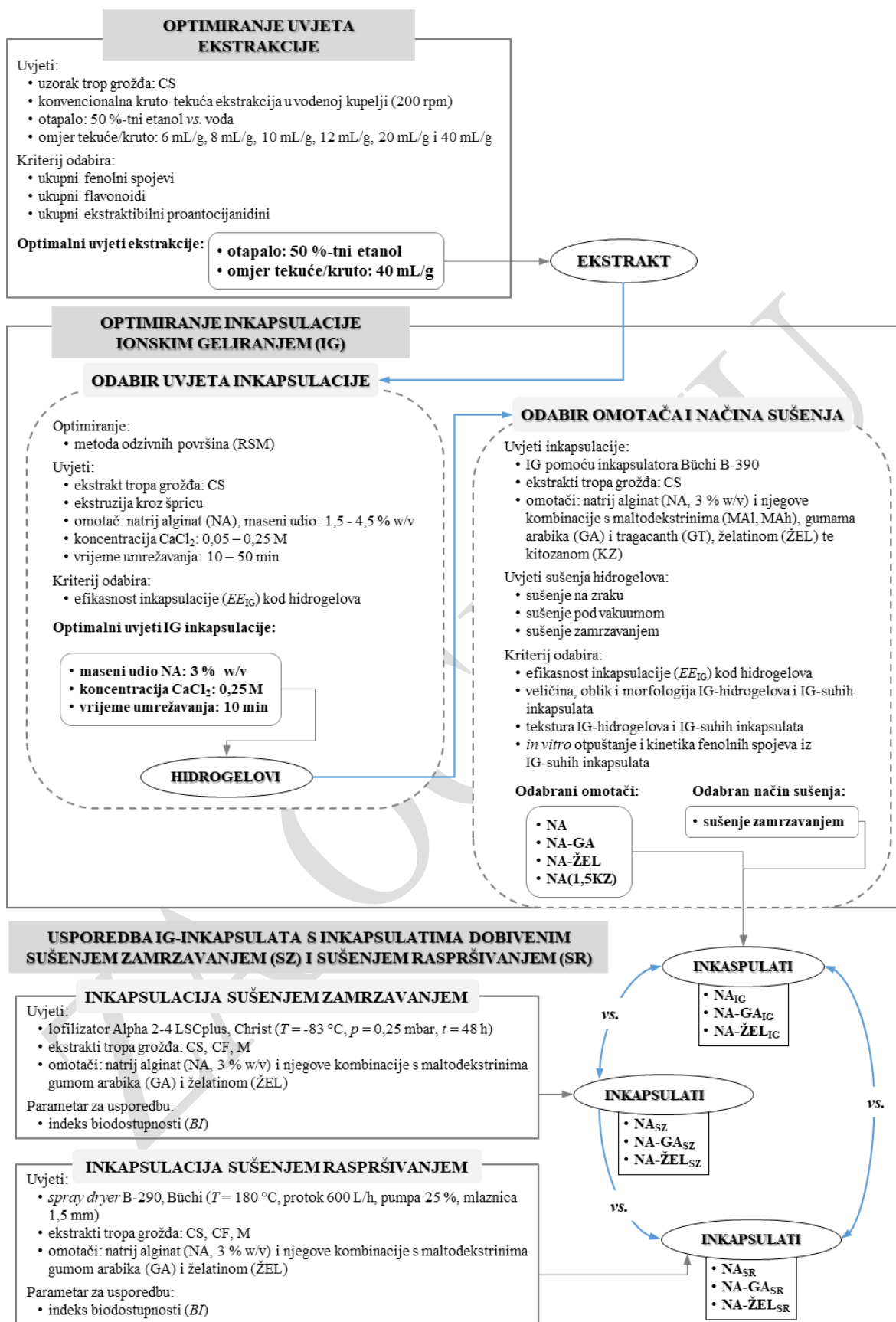
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak doktorskog rada bio je:

- ✓ definirati optimalne procesne uvjete ekstrakcije i koncentriranja za proizvodnju ekstrakata tropa grožđa bogatih fenolnim spojevima,
- ✓ razviti proces inkapsulacije ekstrakata tropa grožđa metodom ionskog geliranja uz primjenu različitih omotača prirodnog porijekla s ciljem povećanja biodostupnosti fenolnih spojeva u probavnom traktu,
- ✓ odrediti geometrijske parametre, morfološka svojstva i teksturalna svojstva inkapsuliranih čestica te utvrditi njihov utjecaj na otpuštanje fenolnih spojeva tijekom simulirane probave *in vitro*,
- ✓ opisati kinetiku otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsuliranih čestica ekstrakta tropa grožđa pomoću matematičkih modela,
- ✓ usporediti utjecaj različitih metoda inkapsulacije (ionsko geliranje, sušenje zamrzavanjem i sušenje raspršivanjem) pomoću odabranih omotača na otpuštanje fenolnih spojeva tijekom simulirane probave *in vitro* i biodostupnost fenolnih spojeva u probavnom traktu.

S obzirom na postavljene ciljeve/zadatke doktorskog rada, istraživanja u okviru eksperimentalnog dijela obuhvaćala su nekoliko povezanih faza. Prvo su definirani optimalni procesni uvjeti kruto-tekuće ekstrakcije za pripremu ekstrakata koji su se koristili za pripremu inkapsulata pomoću različitih omotača baziranih na natrij alginatu. Inkapsulacija ionskim geliranjem bila je vodeća metoda inkapsulacije ekstrakata tropa grožđa te su određeni optimalni procesni uvjeti pri kojima se provodila inkapsulacija. Na temelju karakterizacije pripremljenih inkapsulata (geometrijski parametri, morfološka svojstva i teksturalna svojstva, kinetika otpuštanja fenolnih spojeva u uvjetima simulirane probave *in vitro*) odabrani su omotači koji su korišteni za inkapsulaciju sušenjem zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem. Inkapsulatima pripremljenim s odabranim omotačima pomoću tri metode inkapsulacije određen je indeks biodostupnosti te je provedena usporedba rezultata s obzirom na metodu inkapsulacije, omotač, ekstrakt te njihovu interakciju. Shematski prikaz eksperimentalnog dijela ovog doktorskog rada prikazan je na **Slici 3.1.**



Slika 3.1 Shematski prikaz eksperimentalnog dijela rada

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Uzorci tropa grožđa

Za izradu doktorskog rada korištena su tri različita uzorka crnih sorti tropa grožđa koji su prikupljeni iz vinarije Erdut (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Republika Hrvatska) nakon prerade grožđa u vino:

- CS uzorak (sorta cabernet sauvignon, berba 2018.)
- M uzorak (sorta merlot berba, 2018.)
- CF uzorak (sorta cabernet franc, berba 2020.).

Uzorci su sušeni na zraku (~ 48 h pri temperaturi od $25 - 27$ °C) i skladišteni na sobnoj temperaturi, a prije uporabe za analize samljeveni su na veličinu čestica ≤ 1 mm pomoću ultracentrifugalnog mlina.

3.2.2. Kemikalije

Za provedbu eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije: DL-arabinoza, L-ramnoza, maltotrioza, bezvodni natrij sulfit (98 – 100 %, p.a.), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), amonijev persulfat, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), kitozan srednje molekulske mase, guma arabika (prah), guma tragacanth, natrijeva sol alginske kiseline iz smeđe alge niske viskoznosti, želatina iz kože hladnovodne ribe, maltodekstrin (dekstrozni ekvivalent 4 – 7), maltodekstrin (dekstrozni ekvivalent 16,5 – 19,5), monohidrat galne kiseline (98+% A. C. S. reagent), n-oktanol, (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehin, (-)-epikatehin galat, (-)-galokatehin galat, (+)-katehin hidrat, siringska, elaginska, *p*-kumarinska, *o*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, *p*-hidroksibenzojeva, *p*-hidroksifenilacetatna, klorogenska i sinapinska kiselina, rutin hidrat, tirozol, resveratrol, kempferol, miricetin, celit (opran kiselinom), pepsin iz želučane sluznice svinje (liofilizirani prah, ≥ 2500 U/mg protein), pankreatin iz svinjske gušterače ($8 \times$ USP), svinjski ekstrakt žuči, hemoglobin iz goveđe krvi (prah) i trikloroetena kiselina (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD). Zatim, apsolutni etanol, D-(+)-glukoza, natrijev sulfat, natrijev hidroksid, natrijev klorid, natrijev nitrit, natrijev acetat, natrijev hidrogen fosfat, aceton, kalcij klorid bezvodni (prah), kalijev klorid, kalijev dihidrogen fosfat, natrij hidrogen karbonat, magnezijev klorid heksahidrat, kalcijev klorid dihidrat (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska); metanol HPLC čistoće (J.T. Baker, Arnhem, Nizozemska); acetonitril HPLC čistoće

(Fisher Chemical, Loughborough, UK); ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska); procijanidin B1, procijanidin B2, oenin klorid, kuromanin klorid, kalistefin klorid, peonidin-3-*O*-glukozid klorid, mirtilin klorid i petunidin klorid (Extrasynthese, Genay, Francuska). Kvercetin, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, D-(–)-fruktoza, D-(–)-riboza, D-(+)-celobioza, D-(+)-galaktoza, D-(+)-maltoza monohidrat, D-(+)-manoza, D-(+)-saharoza, heksadeciltrimetilamonij bromid, bakrov sulfat, 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS), natrijev dodecil sulfat, natrijev tetraborat dekahidrat, Trolox, amonijev karbonat (Acros Organics, Geel, Belgija); ε-viniferin (AppliChem, Darmstadt, Njemačka); D-(+)-ksiloza, željezov(II)sulfat heptahidrat, kalijev hidrogenftalat, natrijev karbonat, kalijev nitrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i Folin Ciocalteu reagens (CPA chem, Bogomilovo, Bugarska). BSA otopina – goveđi serumski albumin, željezo(III)klorid heksahidrat (99+%), natrij dihidrogen fosfat hidrat (Acros Organics, New Jersey, SAD); natrijev citrat dihidrat (T.T.T, Sveta Nedjelja, Hrvatska); klorovodična i sumporna kiselina, n-heksan (Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka); aluminijev(III)klorid heksahidrat (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Kandel, Njemačka); 1-butanol, etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA); 2-etoksietanol, fosforna kiselina, natrijev kalijev tartarat tetrahidrat (Fisher Chemical, Loughborough, UK); mravlja kiselina (98 – 100 %) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka); tris(hidroksimetil)sminometan (99,8+ %) (BDH Prolabo, UK).

3.2.3. Uređaji

Prilikom provedbe eksperimentalnog dijela doktorskog rada korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga (Adam Equipment, Nimbus NBL-214i, Kingston, UK)
- analizator vlakana (FIWE 3, VELP Scientifica, Usmate Velate, Italija)
- analizator vlage (Mettler Toledo, HR-73, Zürich, Švicarska)
- blok za razaranje (Behr Labor-Technik GmbH, Behrotest K12, Düsseldorf, Njemačka)
- centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- inkapsulator (Büchi B-390, Flawil, Switzerland)
- liofilizator (Alpha 2-4 LSCplus, Christ, Osterode am Harz, Njemačka)
- mufolna peć (Forns Hobersal, MF12-124, Barcelona, Španjolska)
- preša za brtvljenje (Crucible Sealing Press, Mettler Toledo)
- pretražni elektronski mikroskop (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Tokio, Japan)
- rotator (PTR-60, Grant-bio Instruments, Cambridge, UK)
- rotavapor (Büchi B-210, Flawil, Švicarska)

- skener (EPSON V500 Photo, Epson America Inc., CA, SAD)
- termostat (TC 135 S, Lovibond, Dortmund, Njemačka)
- TOC analizator (TOC-L_{CPH}/CPN, SSM 5000A, Shimadzu, Japan)
- ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM200, Haan, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi B-811 LSV, Flawil, Švicarska)
- uređaj za analizu teksture (TA.XTplus Texture Analyzer, Stable Microsystems Ltd., Surrey, UK)
- uređaj za destilaciju (Behr Labor-Technik GmbH, Behrotest Behr S2, Düsseldorf, Njemačka)
- uređaj za diferencijalnu pretražnu kalorimetriju (Mettler Toledo 821e DSC, Mettler Inc., Schwerzenbach, Švicarska)
- uređaj za nanošenje filma prskanjem (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Uckfield, UK)
- uređaj za rendgensku difrakciju praha (BRUKER D8 Advance diffractometer, Karlsruhe, Njemačka)
- uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti (UHPLC Nexera XR, Shimadzu, Japan)
- UV/VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- vodena kupelj s tresilicom (Julabo, SW-23, Seelbach, Njemačka)
- vorteks (DLab MX-S, Los Angeles, SAD)
- zamrzivač na -80 °C (SWUF Ultra Low Temperature Smart Freezer, Witeg, Wertheim, Njemačka)

3.3. METODE

3.3.1. Analiza kemijskog sastava tropa grožđa

Analiza kemijskog sastava provedena je na čvrstim uzorcima tropa grožđa i u pripremljenim ekstraktima tropa grožđa. Iz čvrstih uzoraka tropa grožđa određen je udio suhe tvari, slobodnih masti, ukupnih proteina, pepela, neutralnih detergent vlakana (*Neutral Detergent Fiber* – NDF), kiselih detergent vlakana (*Acid Detergent Fiber* – ADF), kiselog detergent lignina (*Acid Detergent Lignin* – ADL), hemiceluloze, celuloze, ukupnog ugljika (*Total Carbon* – TC) i anorganskog ugljika (*Inorganic Carbon* – IC); ukupnog organskog ugljika (*Total Organic Carbon* – TOC_{TG}).

U vodenim ekstraktima tropa grožđa određen je udio pojedinačnih šećera (arabinoza, saharoza, glukoza, fruktoza), reducirajućih šećera, ukupnog organskog ugljika (TOC_E), ukupnog dušika (TN) i topljivih proteina. Ekstrakti su pripremljeni prema ranije opisanoj metodi Šelo i sur. (2022). Ukratko, u 1 g tropa grožđa dodano je 25 mL destilirane vode te je ekstrakcija provedena u vodenoj kupelji pri 30 °C s trešnjom 170 rpm tijekom 30 minuta. Nakon završetka kruto-tekuće ekstrakcije, uzorci su centrifugirani pri 10 000 ×g tijekom 10 minuta, a zatim je supernatant (tekući ekstrakt) korišten za analize.

Ukupni fenolni i pojedinačni fenolni spojevi te antioksidacijska aktivnost određeni su u ekstraktima tropa grožđa. Budući da je fokus ovog doktorskog rada na ovim spojevima, priprema ekstrakta tropa grožđa za potrebe određivanja koncentracije ovih spojeva te metode određivanja udjela fenolnih spojeva su prikazani u zasebnom poglavlju (**poglavlje 3.3.2.**).

Sve analize su provedene u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi na suhu tvar uzorka radi bolje usporedivosti dobivenih podataka.

3.3.1.1. Određivanje udjela suhe tvari

Udio suhe tvari u uzorcima određen je brzom termogravimetrijskom metodom upotrebom analizatora vlage. Na integriranu vagu u komori za sušenje postavljena je aluminijska posudica u koju je izvagano oko 3 g uzorka. U komori je zatim provedeno sušenje na 105 °C do konstantne mase uzorka prema standardnoj metodi uz kriterij 3 završetka procesa kojeg karakterizira gubitak mase od 1 mg tijekom 50 sekundi. Udio suhe tvari (%) izračunat je prema izrazu (3.1):

$$w_{s.tv.} (\%) = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (3.1)$$

$w_{s.tv.}$ – udio suhe tvari tropa grožđa (%), m_1 – masa uzorka prije sušenja (g), m_2 – masa uzorka nakon sušenja (g). Sva mjerenja provedena su u tri paralele te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

3.3.1.2. Određivanje udjela slobodnih masti

Za određivanje udjela slobodnih masti korišten je univerzalni sustav za ekstrakciju i standardna Soxhlet metoda AOAC 945.16 (AOAC, 2005a). Metoda se temelji na kontinuiranom

zagrijavanju otapala do vrenja, otparavanju otapala te kondenzaciji para otapala koje prelaze preko uzorka i ekstrahiraju masti.

Postupak

U ekstrakcijsku komoru ekstraktora postavljene su staklene frite sa odvaganim uzorkom (2 g) u filter papiru te je na komoru pričvršćeno hladilo. Kao otapalo korišten je n-heksan koji je dodan u prethodno osušene na 105 °C, ohlađene i izvagane staklene posude. Ekstrakcija je provedena 2 sata, nakon čega je u sklopu ekstraktora provedeno ispiranje uzorka 5 minuta, otparavanje otapala 15 minuta iz ekstrakta koji sadrži masti te sušenje ekstrakta u trajanju od 15 minuta. Staklene posude s ekstraktom (slobodnim mastima) dodatno su sušene u sušioniku na 105 °C tijekom 30 minuta, ohlađene u eksikatoru i izvagane.

Nakon provedbe postupka, udio masti izračunat je prema izrazu (3.2):

$$\text{udio masti (\%)} = \frac{m_E}{m_{uz}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

gdje je: m_E – masa ekstrakta koji je prikupljen u staklenoj posudi i sadrži slobodne masti (g), m_{uz} – masa tropa grožđa korištenog za ekstrakciju (g). Udio masti izražen u postotku (%) preračunat je na suhu tvar uzorka prema izrazu (3.3):

$$\text{udio slobodnih masti (\%}_{s.tv.}\text{)} = \frac{\text{udio masti (\%)}}{\frac{w_{s.tv.}}{100}} \quad (3.3)$$

gdje je: $w_{s.tv.}$ – udio suhe tvari tropa grožđa (%). Analiza je provedena u tri ponavljanja te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.1.3. Određivanje udjela ukupnih proteina

Udio ukupnih proteina određen je indirektno preko udjela dušika u uzorcima metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 2005b). Princip metode temelji se na potpunoj oksidaciji organske tvari zagrijavanjem uzorka koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodavanje katalizatora (bakrovog sulfata) i soli (natrijevog sulfata) pomoću koje se povisuje vrelište. Tijekom oksidacije dolazi do oslobađanja dušika u obliku amonijaka koji u reakciji sa sumpornom kiselinom daje amonijev sulfat. Nadalje, prilikom destilacije oslobađa se amonijak djelovanjem

lužine na amonijev sulfat. Amonijak se predestilira u tikvicu s kiselinom čiji je molaritet poznat, a zatim se višak kiseline odredi titracijom.

Postupak

Na listiće celofana odvagano je $0,2 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$ uzorka koji je zatim umotan u celofan i stavljen u staklene epruvete. U staklene epruvete dodan je natrij sulfat (10 g) i bakrov sulfat (0,1 g) te koncentrirana sumporna kiselina (15 mL), a zatim su epruvete postavljene na stalak za spaljivanje. Nakon 30 minuta, sadržaj epruvete lagano je promiješan te su epruvete spojene na sustav za odsisavanje i postavljene u blok za razaranje koji je prethodno zagrijan na 420°C . Razaranje je izvršeno u trajanju od oko 60 minuta, a nakon toga uzorci su izvađeni i ohlađeni. U ohlađene uzorke dodana je destilirana voda (75 mL) te su epruvete prenesene na uređaj za destilaciju. Nakon dodavanja 35 %-tnog natrijevog hidroksida ($\sim 50 \text{ mL}$) provedena je destilacija i dobiveno je oko 100 mL destilata. Kraj destilacije potvrđen je pomoću indikator papira pomoću kojeg je utvrđen neutralan pH destilata. U tikvicu s uzorkom je zatim dodan indikator i provedena je titracija s 0,1 M natrij hidroksidom. Slijepa proba provedena je na isti način, ali bez uzorka, odnosno u staklenu epruvetu stavljen je prazan listić celofana.

Nakon analize, udio dušika (N) izračunat je prema izrazu (3.4):

$$N (\%) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot f \cdot 0,14}{m_{uz} \cdot 10} \quad (3.4)$$

gdje je: V_1 – volumen natrijevog hidroksida (0,1 M) upotrijebljenog za titraciju slijepa probe (mL), V_2 – volumen natrijevog hidroksida (0,1 M) upotrijebljenog za titraciju ispitivanog uzorka (mL), f – faktor upotrijebljenog 0,1 M natrijevog hidroksida ($f = 1$), m_{uz} – masa uzorka (g).

Udio ukupnih proteina zatim je izračunat množenjem udjela dušika (N) s faktorom 6,25.

3.3.1.4. Određivanje udjela pepela

Udio pepela u tropu grožđa određen je prema gravimetrijskoj metodi AACC-08-03 (AOAC, 1995). Metoda se temelji na potpunom izgaranju uzorka u mufolnoj peći prema uvjetima metode.

Postupak

Prije analiza pripremljeni su porculanski lončići žarenjem u mufolnoj peći (15 min na 550°C) te hlađenjem u eksikatoru ($\sim 1 \text{ h}$). Ohlađeni lončići su izvagani prazni, a zatim je u njih odvagano

uzorak (2 g). Lončići s uzorkom žareni su 4 sata u mufolnoj peći koja je prethodno zagrijana na 600 °C. Nakon žarenja, lončići su stavljani u eksikator na hlađenje te su izvagani. Udio pepela (%) je izračunat prema izrazu (3.5):

$$\text{udio pepela (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (3.5)$$

gdje je: m_1 – masa praznog porculanskog lončića (g), m_2 – masa porculanskog lončića s uzorkom (g), m_3 – masa porculanskog lončića s uzorkom nakon žarenja (g). Potom su rezultati izraženi na suhu tvar uzorka prema izrazu (3.6):

$$\text{udio pepela (\%}_{s.tv.}\text{)} = \frac{\text{udio pepela (\%)}}{\frac{w_{s.tv.}}{100}} \quad (3.6)$$

gdje je: $w_{s.tv.}$ – udio suhe tvari tropa grožđa (%). Analiza je provedena u tri ponavljanja te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.1.5. Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana, kiselih detergent vlakana i kiselog detergent lignina

Prema Van Soest metodi (Goering i Soest, 1970), pomoću analizatora vlakana određen je udio NDF-a, ADF-a i ADL-a.

Priprema otopina

NDF otopina – u 600 mL destilirane vode dodan je natrij tetraborat (6,81 g) koji je otopljen uz zagrijavanje. Potom je dodano 20,6 g EDTA uz snižavanje temperature grijača kako bi se smanjilo isparavanje. U otopinu je zatim dodan natrij dodecil sulfat (30 g), a nakon potpunog otapanja, otopina je prebačena u odmjernu tikvicu volumena 1 L. Nadalje, u 100 mL destilirane vode otopljen je natrij hidrogen fosfat dihidrat (5,72 g) uz zagrijavanje te je otopina dodana u odmjernu tikvicu s prethodnom otopinom. U odmjernu tikvicu je dodan i 2-etoksietanol (10 mL) te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

ADF otopina – uz zagrijavanje u 200 mL destilirane vode otopljen je heksadeciltrimetilamonij bromid (20 g). Nadalje, u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja je uronjena u kupelj s hladnom vodom, dodana je destilirana voda (500 mL), a potom je polako dodana 0,5 M sumporna kiselina (26,76 mL) te prethodno pripremljena otopina heksadeciltrimetilamonij bromida. Tikvica je zatim nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

ADL otopina je 72 %-tna sumporna kiselina – u odmjernu tikvicu volumena 1 L dodana je destilirana voda (~ 250 mL) i 666,304 mL koncentrirane sumporne kiseline (98 %) te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Postupak

Gučevi su prije analiza osušeni u sušioniku (1 sat na 105 °C) te ohlađeni u eksikatoru (~ 30 min), a na isti način pripremljen je i celit. Gučevi s odvaganim celitom (1 g), uzorkom (1 g) i natrij sulfitom (0,5 g) postavljeni su na analizator vlakana. Potom je dodano 100 mL pripremljene NDF otopine za provedbu analize određivanja udjela neutralnih detergent vlakana. Također, dodano je i nekoliko kapi n-oktanola kako bi se smanjilo pjenjenje prilikom zagrijavanja. Uzorci su zagrijani do ključanja gdje je ključanje uz refluks trajalo sat vremena, a nakon toga je provedeno filtriranje i ispiranje kipućom destiliranom vodom (~ 300 mL), a zatim i acetonom (~ 50 mL). Potom su gučevi s uzorcima sušeni u sušioniku na 130 °C tijekom 120 minuta. Ohlađeni gučevi s uzorcima su izvagani i stavljeni na uređaj kako bi se provela analiza kiselih detergent vlakana. ADF analiza provedena je na isti način kao i NDF uz korištenje prethodno pripremljene ADF otopine. Nakon što je ostatak osušen (130 °C, 120 min) i ohlađen provedena je analiza udjela ADL-a tako da je u gučeve, koji su postavljeni na uređaj, dodano 25 mL 72 %-tne sumporne kiseline. Svakih sat vremena uzorak se promiješao, a po završetku analize (3 h) uzorci su isprani kipućom destiliranom vodom, osušeni u sušioniku na 130 °C tijekom 120 minuta i ohlađeni u eksikatoru. Gučevi s uzorcima zatim su žareni na 550 °C u mufolnoj peći 120 minuta.

Udjeli NDF-a, ADF-a i ADL-a izračunati su prema izrazima (3.7 i 3.8):

$$NDF/ADF (\%_{s.tv.}) = \left(\frac{m_1}{m_{uz} \cdot \frac{w_{s.tv.}}{100}} \right) \cdot 100 \quad (3.7)$$

$$ADL (\%_{s.tv.}) = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_{uz} \cdot \frac{w_{s.tv.}}{100}} \right) \cdot 100 \quad (3.8)$$

gdje je: m_{uz} – masa uzorka (g), m_1 – masa uzorka nakon sušenja (g), m_2 – masa uzorka nakon žarenja (g), $w_{s.tv.}$ – udio suhe tvari tropa grožđa (%), NDF, ADF i ADL – udjeli neutralnih, kiselih detergent vlakana te udio kiselog detergent lignina izraženi u postotku po suhoj tvari tropa grožđa (%_{s.tv.}).

Iz dobivenih podataka izračunat je i udio hemiceluloze (3.9) i celuloze (3.10):

$$\text{udio hemiceluloze } (\%_{\text{s.tv.}}) = \text{NDF}(\%_{\text{s.tv.}}) - \text{ADF}(\%_{\text{s.tv.}}) \quad (3.9)$$

$$\text{udio celuloze } (\%_{\text{s.tv.}}) = \text{ADF}(\%_{\text{s.tv.}}) - \text{ADL}(\%_{\text{s.tv.}}) \quad (3.10)$$

dok udio ADL-a predstavlja udio lignina koji se nalazi u uzorku. Svi uzorci su analizirani u tri paralele, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.1.6. Određivanje udjela ukupnog organskog ugljika, ukupnog ugljika i anorganskog ugljika

Uporabom TOC analizatora pomoću modula SSM-5000A metodom katalitičke oksidacije izgaranjem pri 200 °C određen je udio IC, a izgaranjem pri 900 °C udio TC u tropu grožđa (Milaković, 2016; Shimadzu Corporation, 2023). Izračunavanjem razlike udjela TC i IC određen je udio TOC_{TG} .

Postupak

Prije analize, keramičke lađice su žarene na 550 °C tijekom sat vremena, a zatim ohlađene u eksikatoru. Nakon hlađenja u njih je odvagano uzorak trop grožđa (~ 30 mg).

Za provedbu analize IC-a uzorak je prije mjerenja zakiseljen s 25 %-tnom fosfornom kiselinom (300 μL) u svrhu snižavanja pH vrijednosti < 2 kako bi prisutni hidrogenkarbonati i karbonati prešli u ugljikov dioksid. Nadalje, kako bi se provela analiza TC-a izvagani trop grožđa u lađici je pokriven keramičkom vunom prije stavljanja u pećnicu. Produkti izgaranja nošeni su s kisikom pri protoku 500 mL/min do ćelija nedisperzivnog infracrvenog (*Non-Dispersive Infrared* – NDIR) detektora gdje se ugljikov dioksid detektira te se signal bilježi kao pik. Na temelju površine pika (P) iz kalibracijske krivulje je, pomoću softvera, preko regresijskih jednadžbi izračunata masena koncentracija (C' , mg/mL) IC-a (3.11) i TC-a (3.12). Natrij karbonat (0,5 – 2,5 mg C) korišten je kao standard za kalibracijsku krivulju za IC dok je za TC to bio kalijev hidrogenftalat (0,1 – 15 mg C).

$$P = 0,1602 \cdot C' - 10,40 \quad (3.11)$$

$$R^2 = 0,9983$$

$$P = 0,1299 \cdot C' + 14,75 \quad (3.12)$$

$$R^2 = 0,9994$$

Rezultati su izraženi u postotku, a zatim su preračunati na suhu tvar tropa grožđa te izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenja $\pm$ SD.

3.3.1.7. Određivanje udjela reducirajućih šećera

Koncentracija reducirajućih šećera određena je spektrofotometrijski prema DNS metodi (Miller, 1959; Alarcón i sur., 2022). Princip metode temelji se na redoks reakciji slobodnih karbonilnih skupina reducirajućih šećera sa aromatskom 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom pri čemu nastaje 3-amino-5-nitrosalicilna kiselina tamno-narančaste boje koja ima maksimalnu apsorbanciju pri 540 nm (Visvanathan i sur., 2020; de Borja i sur., 2022).

Postupak

DNS reagens pripremljen je otapanjem 3,5-dinitrosalicilne kiseline (2,18 g) u 0,5 M natrijevom hidroksidu (80 mL) uz zagrijavanje i miješanje pri 70 °C do potpunog otapanja. Zatim je dodan natrij kalij tartarat (30 g), a nakon otapanja, otopina je ohlađena na sobnu temperaturu te je nadopunjena destiliranom vodom do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL (Daud i sur., 2019).

U epruvete je dodano 0,5 mL vodenog ekstrakta tropa grožđa te 0,5 mL DNS reagensa, epruvete su zatvorene i uzorci su inkubirani na 100 °C tijekom 5 minuta. Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni uranjanjem epruveta u hladnu vodu tijekom 10 minuta te je s pomoću UV/VIS spektrofotometra izmjerena apsorbancija uzoraka u odnosu na slijepu probu pri 540 nm. Slijepa proba priređena je na isti način, ali je umjesto ekstrakta sadržavala destiliranu vodu. Prilikom izrade kalibracijske krivulje glukoza je korištena kao standard te je masena koncentracija reducirajućih šećera (C') izračunata iz regresijske jednadžbe (3.13):

$$C' = 0,3563 \cdot A + 0,0079 \quad (3.13)$$

$$R^2 = 0,9972$$

gdje je C' – masena koncentracija glukoze ($\text{mg}_{\text{GLU}}/\text{mL}_{\text{uz}}$), A – apsorbancija uzorka pri valnoj duljini 540 nm te R^2 – koeficijent determinacije.

Konačni rezultati su izraženi na masu suhe tvari uzorka odnosno kao maseni udio (C , $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$). Sva mjerenja provedena su u tri paralele te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.1.8. Određivanje udjela ukupnog organskog ugljika u ekstraktima tropa grožđa

Direktnom metodom NPOC (*Non-Purgeable Organic Carbon*) koja se nalazi u softveru (TOC-Control L, verzija 1.04) određena je koncentracija TOC_E . Prije pokretanja analize, prema postavkama metode u softveru, dodatkom 1 M klorovodične kiseline (1,5 %) uklonjen je IC iz tekućeg ekstrakta. Ovim postupkom uz platinu kao katalizator, IC se prevodi u ugljikov dioksid te se dalje, u struji sintetskog zraka, odvodi iz tekuće faze. Na isti način odvođuju se i anorganski visokohlapljivi spojevi.

Ovako pripremljen uzorak stavljen je u oksidacijsku komoru gdje se, pri 680 °C, preostali ugljik oksidira u ugljikov dioksid. Nastali ugljikov dioksid je pomoću sintetskog zraka protoka 150 mL/min transportiran do ćelija NDIR detektora gdje je ugljikov dioksid detektiran (Ćeranić, 2016; Shimadzu Corporation, 2023), a detekcijski signal prikazan je kao pik. Pomoću softvera izračunata je površina ispod pika (P) te je pomoću kalibracijske krivulje izračunata masena koncentracija ukupnog organskog ugljika (C' , mg_C/L) prema regresijskoj jednadžbi (3.14), a dobiveni rezultat preračunat je na suhu tvar tropa grožđa (C , mg_C/g_{s.tv.}).

$$P = 3,951 \cdot C' + 85,67 \quad (3.14)$$

$$R^2 = 0,9996$$

Kalibracijska krivulja za analizu TOC-a izrađena je sa kalijevim hidrogenftalatom kao standardom u rasponu koncentracije od 10 do 100 mg/L.

3.3.1.9. Određivanje udjela ukupnog dušika

Pomoću jedinice za mjerenje ukupnog dušika (*Total Nitrogen Measuring Unit*, TNM-L), određena je koncentracija ukupnog dušika (*Total Nitrogen*, TN) u tekućim ekstraktima tropa grožđa. Metoda mjerenja TN-a temelji se na katalitičkom izgaranju pri temperaturi od 720 °C tijekom kojeg dušik iz uzorka prelazi u dušikov monoksid koji zatim reagira s ozonom i stvara dušikove dioksidge. Kemiluminiscentnim detektorom (*Chemiluminescence Detector*, CLD) detektira se signal dušikovih oksida prikazan kao pik koji je proporcionalan koncentraciji dušika u analiziranom uzorku (Shimadzu Corporation, 2020; Shimadzu Corporation, 2023). Iz površine pika (P) preko kalibracijske krivulje za čiju je izradu korišten kalijev nitrat kao standard u rasponu koncentracija od 0 do 100 mg/L izračunate su koncentracije TN-a (C' , mg_N/L) prema regresijskoj jednadžbi (3.15). Dobiveni rezultat preračunat je na suhu tvar tropa grožđa (C , mg/g_{s.tv.}).

$$P = 7,861 \cdot C' + 30,04 \quad (3.15)$$

$$R^2 = 0,9999$$

3.3.1.10. Određivanje udjela pojedinačnih šećera

Određivanje koncentracije pojedinačnih šećera provedeno je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) pomoću detektora indeksa loma (*Refractive Index Detector*, RID) prema metodama koje su priložene uz korištene kolone. Pomoću Nucleogel® Sugar Pb kolone (VA, 300 × 7,8 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka) određena je masena koncentracija šećera arabinoze, fruktoze i glukoze, gdje je kao mobilna faza korištena ultračista voda s protokom 0,4 mL/min, a trajanje metode iznosilo je 20 minuta pri 80 °C. Nadalje, pomoću Aminex® HPX kolone (HPX 87H, 300 × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) određena je masena koncentracija saharoze uporabom 5 mM sumporne kiseline kao mobilne faze s protokom 0,6 mL/min tijekom 60 min pri 40 °C. Na temelju usporedbe retencijskih vremena te spektralnih podataka sa standardima identificirani su pojedinačni šećeri, a analiza podataka provedena je pomoću softvera LabSolutions (verzija 5.87).

Iz kalibracijskih krivulja za svaki pojedini šećer, prema linearnim regresijskim jednadžbama navedenim u **Tablici 3.1**, izračunate su masene koncentracije pojedinačnih šećera (C' , mg/mL) te su preračunate na masu suhe tvari uzorka. Sva mjerenja provedena su u tri paralele te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

Tablica 3.1 Prikaz linearnih regresijskih jednadžbi za izračun masenih koncentracija pojedinačnih šećera (C' , mg/L) određenih pomoću UHPLC-a

Šećer	Linearna regresijska jednadžba
Arabinoza	$P = 218160,63 \cdot C' + 31070,06$
Fruktoza	$P = 156272,11 \cdot C' + 28,50$
Glukoza	$P = 210520,91 \cdot C' - 18,08$
Saharoza	$P = 100128,34 \cdot C' + 11,10$

P – površina ispod pika. Koeficijent determinacije (R^2) svih navedenih regresijskih jednadžbi iznosio je 1

3.3.1.11. Određivanje udjela topljivih proteina Bradfordičinom metodom

Bradfordičina metoda određivanja koncentracije topljivih proteina temelji se na stvaranju kompleksa protein-boja, odnosno vezanju bazičnih i aromatskih bočnih ogranaka proteina i

anionskog oblika Coomassie Brilliant Blue G-250 boje. Nastali kompleks u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini 595 nm (Bradford, 1976; Strelec i Kovač, 2014).

Postupak

Neposredno prije analiza je svježe pripremljen Bradfordin reagens razrjeđivanjem s destiliranom vodom u omjeru 1 : 4. U kivete je otpipetirano 0,1 mL ekstrakta tropa grožđa i dodano 2 mL Bradfordinog reagensa te je apsorbancija reakcijske smjese izmjerena spektrofotometrijski nakon 5 minuta na valnoj duljini 595 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali je umjesto uzorka sadržavala 0,1 mL destilirane vode. Kalibracijska krivulja je pripremljena uporabom goveđeg serumskog albumina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) kao standarda otopljenog u poznatim koncentracijama (0,1 – 0,6 mg/mL). Iz eksperimentalnih podataka linearnom regresijom dobivena je ovisnost masene koncentracije BSA o očitanoj apsorbanciji (A) i prikazana jednadžbom (3.16) prema kojoj je izračunata masena koncentracija proteina u ekstraktima (C' , mg_{BSA}/mL).

$$C' = 1,2783 \cdot A - 0,0159 \quad (3.16)$$

$$R^2 = 0,9959$$

Konačni rezultati su preračunati na masu suhe tvari uzorka (C , mg/g_{s.tv.}). Sva mjerenja provedena su u tri paralele te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.2. Određivanje udjela fenolnih spojeva

Koncentracija fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa određivana je iz tekućih ili suhih ekstrakata. U slučaju suhih ekstrakata, oni su prije analize otapani u ogovarajućem otapalu u poznatoj koncentraciji. Za određivanje koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (UF), ukupnih flavonoida (UFL) i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (UPA) korištene su spektrofotometrijske metode, a za određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva i antocijana kromatografske odnosno UHPLC metode. Sva mjerenja provedena su u tri paralele, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja $\pm$ SD.

3.3.2.1. Priprema ekstrakata tropa grožđa

U cilju dobivanja što većeg prinosa fenolnih spojeva istražen je utjecaj vrste otapala (destilirana voda i 50 %-tna vodena otopina etanola) i omjer konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije (6

mL/g, 8 mL/g, 10 mL/g, 12 mL/g, 20 mL/g, 40 mL/g) na prinos fenolnih spojeva iz tropa grožđa CS. Kako bi se osigurao odgovarajući omjer tekuće (otapalo) – kruto (trop grožđa) izvagana je određena masa tropa grožđa u tamne bočice s čepom te je u svaku bočicu dodano 60 mL otapala (50 %-tna vodena otopina etanola ili destilirana voda), a ekstrakcija je zatim provedena u vodenoj kupelji pri na 80 °C trešnji od 200 rpm tijekom 120 minuta (Šelo i sur., 2022). Dobivene suspenzije nakon ekstrakcija su centrifugirane 10 minuta na $11\,000 \times g$ te je odvojen tekući ekstrakt od taloga. Tekući CS ekstrakt je korišten za određivanje koncentracije UF-a, UFL-a i UPA. Na osnovi rezultata određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva (omjer tekuće-kruto: 40 mL/g i otapalo: 50%-tna vodena otopina etanola). Pri utvrđenim optimalnim uvjetima dalje su se pripremali svi ispitivani ekstrakti koji su dodatno koncentrirani do suhog za potrebe određivanja koncentracije ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva u svim ispitivanim ekstraktima tropa grožđa (CS, CF i M) i njihove antioksidacijske aktivnosti te za potrebe inkapsulacije i dugih vezanih analiza. Koncentriranje je provedeno uparavanjem u tikvicama okruglog dna koje su prethodno osušene, ohlađene u eksikatoru i izvagane. Uparavanje do suhog je provedeno na rotavaporu pri temperaturi vodene kupelji 50 °C te pod tlakom od 48 mbar. Nakon uparavanja tikvice su ohlađene u eksikatoru, izvagane, a suhi ekstrakt ostrugan je sa stijenki tikvice i čuvan za daljnje analize na +4 °C. U slučaju suhih ekstrakata, oni su se prije određivanja koncentracije fenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti otapali u vodenim otopinama etanola (u različitim koncentracijama ovisno o analizi) pri čemu je bila poznata početna koncentracija otopljenog ekstrakta.

3.3.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva

UF određeni su Folin-Ciocalteuovom spektrofotometrijskom metodom (Waterhouse, 2001). Metoda se temelji na oksidacijsko-redukcijskim procesima između Folin-Ciocalteuovog reagensa, polimernog kompleksnog iona molibdena i volframa, i hidroksilnih skupina prisutnih fenolnih spojeva. Dodatkom natrij karbonata postiže se lužnati medij u reakcijskoj smjesi te dolazi do deprotonacije hidroksilnih skupina fenolnih spojeva koji se oksidiraju Folin-Ciocalteuovim reagensom. Redukcija reagensa se očituje u promijeni boje iz žute u plavu čija se apsorbancija mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini 765 nm (Stratil i sur., 2006).

Postupak

U epruvetu je otpipetirano 3160 μL destilirane vode, 40 μL uzorka i 200 μL Folin-Ciocalteuovog reagensa, a zatim je reakcijska otopina promiješana na vorteksu. Nakon 8 minuta, u epruvetu je dodano 600 μL 20 %-tne otopine natrij karbonata, uzorci su promiješani

i inkubirani 30 minuta na 40 °C u vodenoj kupelji. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodan isti volumen ekstrakcijskog otapala. Inkubiranjem je razvijeno plavo obojenje reakcijske otopine čija je apsorbancija mjerena na UV/VIS spektrofotometru na valnoj duljini 765 nm. Kalibracijska krivulja pripremljena je uporabom galne kiseline kao standarda u rasponu koncentracija od 0,05 do 1 mg/mL. S obzirom na to da su u ovom doktorskom radu određivane koncentracije ukupnih fenolnih tvari u ekstraktima pripremljenim s različitim otapalima zbog različitih zahtjeva pojedinih analiza, izrađene su kalibracijske krivulje za svako korišteno otapalo te su dobivene regresijske jednadžbe koje pokazuju ovisnost masene koncentracije galne kiseline ($C'_{gal.k.}$, mg/mL) i očitane apsorbanije (A) na spektrofotometru pri 765 nm prikazane u **Tablici 3.2**.

Tablica 3.2 Prikaz regresijskih jednadžbi za izračun masenih koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (C' , mg/mL) za pripadajuće otapalo korišteno za pripremu kalibracijskih krivulja

Otapalo	Regresijska jednadžba	Koeficijent determinacije	Upotreba
50%-tni etanol	$C'_{gal.k.} = 0,975 \cdot A - 0,011$	$R^2 = 0,9986$	optimiranje ekstrakcije UF-a
destilirana voda	$C'_{gal.k.} = 0,9575 \cdot A - 0,0098$	$R^2 = 0,9993$	optimiranje ekstrakcije UF-a
	$C'_{gal.k.} = 1,0188 \cdot A + 0,018$	$R^2 = 0,9996$	UF u ekstraktima
metanol	$C'_{gal.k.} = 1,094 \cdot A + 0,0818$	$R^2 = 0,9912$	UF nakon simulirane probave

$C'_{gal.k.}$ – koncentracija galne kiseline (mg/mL), A – očitana apsorbanija uzorka

Iz odgovarajuće kalibracijske krivulje odnosno regresijske jednadžbe izračunate su masene koncentracije fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline (*Gallic Acid Equivalents*, GAE) (mg_{GAE}/mL). Zbog preciznije usporedbe rezultata, masene koncentracije su preračunate na suhu tvar tropa grožđa (C_{UF} , mg_{GAE}/g_{s.tv.}) ili na masu ekstrakta (mg_{GAE}/100 mg_E).

3.3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

Kolorimetrijskom metodom s pomoću aluminij klorida određene su koncentracije UFL-a. Aluminij iz heksahidrata aluminijevog klorida stvara nestabilne komplekse s ortodihidroksilnim skupinama u A ili B prstenu flavonoida te stabilne komplekse u kiselom mediju s C-4 keto skupinom ili C-3 i C-5 hidroksilnom skupinom prisutnih flavona i flavonola, pri čemu nastaje narančasto obojenje otopine čija se apsorbancija može mjeriti na 510 nm (Chang i sur., 2002).

Postupak

U epruvete je otpipetirano 2 mL destilirane vode i 500 μ L ekstrakta tropa grožđa. Zatim je dodano 150 μ L natrijevog nitrita (5 %, w/v), a nakon 5 minuta 150 μ L 10 %-tne vodene otopine aluminijevog klorida heksahidrata. Reakcijska smjesa je promiješana i nakon 6 minuta dodan je 1 mL 1 M natrijevog hidroksida te je, kako bi ukupni volumen reakcijske smjese bio 5 mL, dodano još 1,2 mL destilirane vode. Neposredno nakon miješanja reakcijske smjese izmjerena je apsorbancija uzoraka na valnoj duljini od 510 nm. Slijepa proba je umjesto uzorka odnosno ekstrakta sadržavala destiliranu vodu. Kao standard je korišten (+)-katehin u rasponu koncentracija od 0,02 do 0,2 mg/mL. Iz ovisnosti masene koncentracije (+)-katehina ($C'_{katehin}$, $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) i očitane apsorbancije (A), na spektrofotometru pri 510 nm, linearnom regresijom dobivena je jednadžba (3.17) koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije UFL-a izražene u ekvivalentima (+)-katehina (*Catechin Equivalents*, CE) ($\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$).

$$C'_{katehin} = 0,3267 \cdot A + 0,0056 \quad (3.17)$$

$$R^2 = 0,9996$$

Konačni rezultati preračunati su na suhu tvar uzorka (C_{UFL} , $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.v.}}$) ili na masu ekstrakta ($\text{mg}_{\text{CE}}/100 \text{ mg}_E$).

3.3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

UPA u uzorcima određeni su spektrofotometrijskom metodom (Avallone i sur., 1997; Schofield i sur., 2001; Škerget i sur., 2005) temeljenoj na depolimerizaciji proantocijanidina u butanolu u kiselom mediju. Prilikom reakcije dolazi do crvenog obojenja koje pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 540 nm.

Postupak

Prije analize pripremljena je otopina željezo(II) sulfata heptahidrata otapanjem 77 mg $\text{FeSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$ u 500 mL otopine kloridne kiseline : 1-butanol pomiješane u omjeru 2 : 3. U 0,5 mL ekstrakta dodano je 5 mL otopine željezo(II) sulfata heptahidrata te su uzorci inkubirani 15 minuta na 95 °C. Nakon inkubacije, uzorci su naglo ohlađeni pod mlazom hladne vode nakon čega je izmjerena njihova apsorbancija na valnoj duljini 540 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci, ali je umjesto uzorka dodana destilirana voda. Masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (C'_{UPA} , g/L) izračunata je preko izraza (3.18):

$$C'_{UPA} = \frac{A \cdot M \cdot DF}{\varepsilon \cdot l} \quad (3.18)$$

gdje je: A – apsorbancija, M – molekularna masa cijanidina (287 g/mol), DF – faktor razrjeđenja ($DF = 11$; omjer ukupnog volumena reakcijske smjese za određivanje UPA i volumena ekstrakta), ε – koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina (34700 L/mol·cm) i l – duljina optičkog puta ($l = 1$ cm). Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina preračunate su na suhu tvar (C_{UPA} , mg/g_{s.tv.}) ili na masu ekstrakta (mg/100 mg_E).

3.3.2.5. Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva

Prema metodi koju su objavili Bucić-Kojić i sur. (2017) provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih spojeva. Metoda je provedena reverzno-faznom UHPLC metodom pomoću detektora s nizom fotodioda (*Photodiode Array Detector*, PDA). Detekcija fenolnih spojeva provedena je snimanjem spektra u području valnih duljina između 252 i 372 nm, a njihovo razdvajanje korištenjem Kinetex® C18 kolone (100 × 4,6 mm, 2,6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Prije provođenja analize, uzorci su filtrirani kroz filtere veličine pora 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka). Korištena je linearno gradijentna metoda uz primjenu dvaju mobilnih faza, mobilna faza A sastoji se od 1 % (v/v) vodene otopine ledene octene kiseline, a B mobilna faza od metanola i acetonitrila u omjeru 1 : 1 (v/v). Razdvajanje spojeva je provedeno pri 30 °C, 0 – 25 min od 5 % do 30 % B, 25 – 35 min od 30 % do 40 % B, 35 – 40 min od 40 % do 48 % B, 40 – 50 min od 48 % do 70 % B, 50 – 55 min od 70 % do 100 % B, zatim izokratno 55 – 60 min 100 % B, a od 60 – 70 min slijedi povratak na početne uvjete te ekvilibracija kolone. Tijekom provedbe metode protok mobilnih faza iznosio je 1 mL/min, a volumen injektiranja uzoraka 20 μL. Pomoću softvera LabSolutions 5.87 obrađeni su dobiveni podaci, a usporedbom retencijskih vremena i UV/VIS spektra standarda i dobivenih podataka, identificirani su pojedinačni fenolni spojevi. Prema potrebi, kvantifikacija je provedena metodom primjene vanjskog standarda. Fenolni spojevi prema skupinama, detektirani su u navedenim spektrima: hidroksicimetne kiseline na 276 – 325 nm i hidroksibenzojeve kiseline na 252 – 280 nm, procijanidini na 278 nm, flavanoli na 269 – 278 nm i flavonoli na 355 – 372 nm te stilbeni na 305 – 323 nm. Standardi fenolnih spojeva otapani su metanolu u poznatim koncentracijama te analizirani na isti način kao i uzorci. Iz ovisnosti površine (P) ispod pika i koncentracije određenog standarda linearnom regresijom dobivene su jednačbe prikazane u **Tablici 3.3** koje

su korištene za izračunavanje masene koncentracije pojedinog fenolnog spoja (C' , mg/mL), a konačni rezultati su preračunati na suhi ekstrakt uzorka (C , $\mu\text{g}/100 \text{ mgE}$).

Tablica 3.3 Prikaz linearnih regresijskih jednadžbi korištenih za izračunavanje masene koncentracije (C' , mg/mL) pojedinačnih fenolnih spojeva

	Fenolni spoj	Linearna regresijska jednadžba
<i>Hidroksibenzojeve kiseline</i>	3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	$P = 35033,61 \cdot C' + 1,78$
	Galna kiselina	$P = 23809,31 \cdot C' + 4,78$
	<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	$P = 92295,88 \cdot C' + 6,11$
	Siringinska kiselina	$P = 27222,88 \cdot C' - 2,68$
	Vanilinska kiselina	$P = 76658,71 \cdot C' - 8,08$
	Elaginska kiselina	$P = 74720,09 \cdot C' + 21,10$
	<i>p</i> -Hidroksifenilacetatna kiselina	$P = 3315,63 \cdot C' - 0,13$
<i>Hidroksicimetne kiseline</i>	Kafeinska kiselina	$P = 60814,3 \cdot C' - 6,07$
	Ferulinska kiselina	$P = 48925,00 \cdot C' - 9,60$
	<i>o</i> -Kumarinska kiselina	$P = 30878,14 \cdot C' + 0,38$
	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	$P = 116325,32 \cdot C' - 29,18$
	Sinapinska kiselina	$P = 40905,37 \cdot C' + 4,38$
	Klorogenska kiselina	$P = 25230,75 \cdot C' - 2,72$
<i>Flavanoli</i>	Katehin	$P = 3903,82 \cdot C' + 0,24$
	Epikatehin	$P = 4776,52 \cdot C' + 0,71$
	Epikatehin galat	$P = 11112,57 \cdot C' + 0,26$
	Galokatehin galat	$P = 3419,06 \cdot C' - 5419,77$
	Epigalokatehin	$P = 1456,71 \cdot C' - 0,34$
	Procijanidin B1	$P = 2391,59 \cdot C' + 0,66$
	Procijanidin B2	$P = 3125,05 \cdot C' + 0,53$
<i>Flavonoli</i>	Kvercetin	$P = 32774,54 \cdot C' - 3,15$
	Miricetin	$P = 18195,90 \cdot C' - 1,61$
	Rutin	$P = 11760,79 \cdot C' - 3,01$
	Kempferol	$P = 39044,57 \cdot C' - 3,50$
<i>Stilbeni</i>	Resveratrol	$P = 45937,43 \cdot C' - 668,83$
	ϵ -Viniferin	$P = 31838,80 \cdot C' + 5,94$

P – površina ispod pika. Koeficijent determinacije (R^2) svih navedenih regresijskih jednadžbi iznosio je 1

3.3.2.6. Određivanje koncentracije pojedinačnih antocijana

Kvantitativna i kvalitativna analiza pojedinačnih antocijana provedena je pomoću UHPLC-a prema metodi Bucić-Kojić i sur. (2017) s određenim izmjenama. Razdvajanje antocijana provedeno uporabom Kinetex® C18 kolone (100 × 4,6 mm, 2,6 μm , Phenomenex, Torrance, CA, SAD) te je detekcija spojeva provedena snimanjem spektra u području valnih duljina između 503 i 531 nm korištenjem PDA detektora. Uzorci su pripremljeni filtriranjem kroz filtere veličine pora 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka). Upotrijebljene mobilne faze sastojale su se od redestilirane vode : mravlje

kiseline : acetonitrila (87 : 10 : 3, v/v/v; mobilna faza A) i redestilirane vode : mravlje kiseline : acetonitrila (40 : 10 : 50, v/v/v; mobilna faza B). Program gradijenta bio je sljedeći: 10 minuta od 10 do 25 % mobilne faze B, 5 minuta od 25 do 31 % mobilne faze B, 5 minuta od 31 do 40 % mobilne faze B, 10 minuta od 40 do 50 % mobilne faze B, 10 min od 50 do 100 % mobilne faze B, 10 min od 100 do 10 % mobilne faze B. Volumen injektiranog uzorka bio je 20 μ L i protok mobilnih faza 0,8 mL/min. Usporedbom spektra te retencijskih vremena dobivenih podataka sa standardima identificirani su pojedinačni antocijani, a zatim su obrađeni uporabom LabSolutions 5.87 softvera. Kvantifikacija je provedena metodom primjene vanjskog standarda. Standardi fenolnih spojeva otapani su metanolu u poznatim koncentracijama te analizirani na isti način kao i uzorci. Iz ovisnosti površine (P) ispod pika i koncentracije određenog standarda linearnom regresijom dobivene su jednadžbe (**Tablica 3.4**) koje su korištene za izračunavanje masene koncentracije pojedinog antocijana (C' , $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$) koje su potom preračunate su na suhu tvar uzorka radi točnije usporedbe rezultata (C , mg/g_{s.tv.}).

Tablica 3.4 Prikaz linearnih regresijskih jednadžbi korištenih za izračunavanje masene koncentracije (C') pojedinačnih antocijana

Antocijani	Linearna regresijska jednadžba
Kalistefin klorid	$P = 22483,49 \cdot C' - 0,75$
Kuromanin klorid	$P = 26125,07 \cdot C' + 1,60$
Mirtilin klorid	$P = 24967,60 \cdot C' + 3,77$
Peonidin 3- <i>O</i> -glukozid klorid	$P = 24715,05 \cdot C' - 7,52$
Petunidin klorid	$P = 37080,31 \cdot C' - 1,65$
Oenin klorid	$P = 31051,39 \cdot C' - 0,17$

P – površina ispod pika. Koeficijent determinacije (R^2) svih navedenih regresijskih jednadžbi iznosio je 1

3.3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa uzoraka korištene su tri spektrofotometrijske metode (DPPH, ABTS i FRAP metoda). Prilikom analiza, mjerenja su provedena u tri ponavljanja te izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Radi vjerodostojnije usporedbe triju metoda, rezultati su izraženi u ekvivalentima troloksa (*Trolox Equivalent*, TE) (C' , mg_{TE}/mL), koji je analog vitamina E i vrlo snažan antioksidans te je korišten kao standard za izradu kalibracijskih krivulja za svaku metodu.

3.3.3.1. DPPH metoda

Ova metoda temelji se na principu da antioksidansi reduciraju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH•) donacijom vodika pri čemu se smanjuje koncentracija slobodnog DPPH• što

se očituje u promjeni boje reakcijske otopine iz ljubičaste u žutu i odgovara smanjenju apsorbancije reakcijske otopine u odnosu na otopinu DPPH• pri valnoj duljini od 515 nm (Benvenuti i sur., 2004; Bucić-Kojić, 2008).

Postupak

Otopina DPPH• radikala pripremljena je u koncentraciji 0,026 mg_{DPPH•}/mL otapanjem u 96 %-tnom etanolu te je izmjerena njegova apsorbancija u odnosu na slijepu probu, odnosno 96 %-tni etanol. U staklene epruvete dodano je 100 µL uzorka te 3,9 mL pripremljene alkoholne otopine DPPH• te je reakcijska otopina ostavljena na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi kako bi se omogućila redukcija radikala. Nakon 30 minuta reakcije očitana je apsorbancija reakcijske otopine na valnoj duljini 515 nm u odnosu na slijepu probu. Prema izrazu (3.19) izračunat je postotak inhibicije DPPH• u prisutnosti antioksidansa odnosno ekstrakta tropa grožđa:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} \bullet = \left(\frac{A_{\text{DPPH} \bullet} - A_{\text{uz}}}{A_{\text{DPPH} \bullet}} \right) \cdot 100 \quad (3.19)$$

gdje je: $A_{\text{DPPH} \bullet}$ – apsorbancija pripremljenog DPPH• u koncentraciji 0,026 mg_{DPPH•}/mL i A_{uz} – apsorbancija uzorka.

Iz kalibracijske krivulje dobivena je regresijska jednadžba (3.20) koja pokazuje ovisnost koncentracije troloksa (C'_{troloksa} , mg/mL) i % inhibiranog DPPH• te je prema toj jednadžbi izračunata antioksidacijska aktivnost uzoraka i izražena u ekvivalentima troloksa (DPPH, mg_{TE}/mL):

$$C'_{\text{troloksa}} = 0,0035 \cdot \% \text{ inhibicije DPPH} \bullet + 0,0038 \quad (3.20)$$

$$R^2 = 0,9978$$

3.3.3.2. ABTS metoda

Princip ABTS metode temelji se na redukciji stabilnog ABTS radikalskog kationa (ABTS•⁺) u prisutnosti antioksidansa što se očituje u obezbojenju plavo zelene boje otopine ABTS•⁺-a odnosno u smanjenju vrijednosti apsorbancije mjerene na 734 nm. Stabilni ABTS•⁺ se priprema reakcijom amonij persulfata sa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijevom soli (ABTS) (Re i sur., 1999).

Postupak

Za pripremu stabilne otopine $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -a prije analize, 7 mM vodena otopina ABTS-a inkubirana je 12 do 16 sati na sobnoj temperaturi i u potpunom mraku s 2,45 mM vodenom otopinom amonij persulfata, u omjeru 1 : 1. Dobivena otopina $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -a ima tamno zelenu boju i daje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 734 nm. Međutim, upotreba ove koncentrirane otopine u analizi može dovesti do nepouzdanih rezultata. Stoga, za pouzdanost analitičkih mjerenja, preporuča se razrjeđivanje otopine $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -a etanolom. Dakle, neposredno prije analize, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ razrijeđen je apsolutnim etanolom u omjeru 1 : 40 sve dok apsorbancija na 734 nm nije iznosila $0,706 \pm 0,002$. Zatim je u 50 μL uzorka dodano 950 μL razrijeđenog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -a, reakcijska smjesa je promiješana na vorteksu te inkubirana na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta očitana je apsorbancija na valnoj duljini 734 nm. Kontrola je pripremljena na isti način, ali umjesto uzorka dodan je apsolutni etanol. Također, apsolutni etanol je korišten kao slijepa proba. Inhibicija (%) $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -a izračunata je prema izrazu (3.21):

$$\% \text{ inhibicije } \text{ABTS}^{\bullet+} = \left(\frac{A_K - A_{uz}}{A_K} \right) \cdot 100 \quad (3.21)$$

gdje je: A_K – apsorbancija kontrolnog uzorka i A_{uz} – apsorbancija uzorka.

Iz kalibracijske krivulje dobivena je regresijska jednadžba (3.22) koja pokazuje ovisnost koncentracije troloksa (C'_{troloksa} , mg/mL) i % inhibiranog $\text{ABTS}^{\bullet+}$ te je prema toj jednadžbi izračunata antioksidacijska aktivnost uzoraka i izražena u ekvivalentima troloksa (ABTS , $\text{mg}_{\text{TE}}/\text{mL}$):

$$C'_{\text{troloksa}} = 0,003 \cdot \% \text{ inhibicije } \text{ABTS}^{\bullet+} - 0,0037 \quad (3.22)$$

$$R^2 = 0,9950$$

3.3.3.3. FRAP metoda

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se na principu redukcije kompleksa željezo(III) i 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fe^{3+} -TPTZ) u Fe^{2+} -TPTZ u prisustvu antioksidansa. Redukcijom Fe^{3+} -TPTZ kompleksa stvara se plavo obojeni kompleks čija apsorbancija se očitava spektrofotometrijski pri 592 nm (Jolić, 2017).

Postupak

FRAP reagens pripremljen je miješanjem 25 mL acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6) zagrijanog na 37 °C; 2,5 mL otopine TPTZ reagensa (10 mM, otopljen u 40 mM klorovodičnoj kiselini) i 2,5 mL vodene otopine željezo(III) klorid heksahidrata (20 mM). U epruvete je otpipetirano 150 µL uzorka, 270 µL destilirane vode i 2,7 mL FRAP reagensa. Reakcijska otopina je promiješana na vorteksu te inkubirana na 37 °C u mraku tijekom 40 minuta. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodavana destilirana voda. Nakon inkubacije, očitana je apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini 592 nm. Rezultati su izraženi u ekvivalentima troloksa koji je korišten kao standard (FRAP, mg_{TE}/mL) preko regresijske jednadžbe (3.23) koja pokazuje ovisnost koncentracija troloksa ($C'_{troloksa}$, mg/mL) o očitanim apsorbancijama (A).

$$\begin{aligned}C'_{troloksa} &= 0,142 \cdot A - 0,0002 \\ R^2 &= 0,9991\end{aligned}\tag{3.23}$$

3.3.4. Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa ionskim geliranjem

Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa bogatih fenolnim spojevima provedena je pomoću tri metode: ionskim geliranjem, sušenjem zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem. Kao glavna metoda korišteno je ionsko geliranje, a odabrani omotači s kojima su ostvareni najbolji rezultati inkapsulacije korišteni su i kod ostale dvije metode inkapsulacije.

Ionsko geliranje je kemijsko-fizikalna metoda inkapsulacije koja se temelji na sposobnosti umrežavanja polielektrolita u prisutnosti viševalentnih iona (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}), a može se provoditi emulzifikacijom ili ekstruzijom. Ekstruzija je najčešće korištena metoda za proizvodnju geliranih sferičnih čestica kapanjem vodene otopine polimera kroz mlaznicu u otopinu za umrežavanje (geliranje) koja sadrži viševalentne ione (Ozkan i sur., 2019).

U ovom radu ionsko geliranje je provedeno ekstruzijom ekstrakta tropa grožđa uporabom omotača prirodnog porijekla, a za umrežavanje je korištena otopina kalcij klorida (CaCl_2).

3.3.4.1. Ionsko geliranje pomoću šprice - optimiranje uvjeta inkapsulacije

Optimiranje procesnih uvjeta inkapsulacije (koncentracija omotača, koncentracija otopine za umrežavanje te vrijeme umrežavanja) s obzirom na maksimalnu učinkovitost inkapsulacije provedeno je metodom odzivnih površina (*Response Surface Methodology*, RSM). RSM je multivarijantna statistička i matematička metoda koja daje uvid u pojedinačni utjecaj svakog

ispitivanog parametra na promatrani proces, ali i njihovu interakciju uz minimalan broj potrebnih eksperimenata, a temelji se na aproksimaciji eksperimentalnih podataka empirijskim modelom (npr. jednadžbom polinoma). U ovom radu, za dizajniranje eksperimenta kao i za statističku obradu podataka te određivanje optimalnih uvjeta inkapsulacije unutar ispitivanih parametara, korišten je Box-Behnken dizajn primjenom softvera Design Expert 12 (Stat-Ease Inc., SAD). Box-Behnken je dizajn koji se koristi za modele drugog reda (kvadratni polinom), odnosno daje kvadratni odziv površine i ovisnost zavisne varijable (npr. učinkovitost inkapsulacije) o ispitivanim varijablama, informacije o njihovim interakcijama te o minimumu i maksimumu funkcije (Bezerra i sur., 2008). Ovaj dizajn uzima u obzir točke u sredini rubova i središtu kubičnog prostora, a broj eksperimenata (B) se određuje prema slijedećem izrazu (3.24):

$$B = 2^k(k - 1) + c_p \quad (3.24)$$

gdje je k broj faktora (ispitivanih varijabli), a c_p je broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki. Osim toga, dizajn zahtjeva da ispitivane varijable budu svedene na tri razine s jednakim intervalom između razina pojedine varijable.

U ovom radu odabrani su procesni parametri inkapsulacije za koje je procijenjeno da mogu imati značajan utjecaj na učinkovitost inkapsulacije fenolnih tvari iz ekstrakata tropa grožđa uključujući maseni udio NA, koncentraciju otopine za umrežavanje odnosno otopine CaCl_2 i vrijeme umrežavanja hidrogelova (Tablica 3.5).

Tablica 3.5 Razine ispitivanih nezavisnih varijabli (parametri inkapsulacije) procesa inkapsulacije CS ekstrakata ionskim geliranjem u svrhu praćenja njihovog utjecaja na učinkovitost inkapsulacije

Ispitivani parametri (varijable)		Donja razina	Centralna razina	Gornja razina
X_1	maseni udio NA (% w/v)	1,5	3,0	4,5
X_2	koncentracija CaCl_2 (M)	0,05	0,15	0,25
X_3	vrijeme umrežavanja (min)	10	30	50

Iz tri ispitivana parametra u tri razine prema Box-Behnkenovom planu pokusa izvedeno je petnaest kombinacija eksperimenata (matrica plana pokusa zajedno s rezultatima učinkovitosti inkapsulacije prikazana je u poglavlju 4.4.1.).

Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani s matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda u obliku (3.25):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.25)$$

gdje su:

Y – modelom predviđena odzivna funkcija (učinkovitost inkapsulacije),

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,

β_i – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

$X_{i,j}$ – ispitivane nezavisne varijable (maseni udio NA, koncentracija CaCl_2 , vrijeme umrežavanja) i

k – broj varijabli.

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Postupak inkapsulacije

Suhi koncentrirani ekstrakt CS uzorka (500 mg) otapan je 10 min u 3 mL etanola na magnetnoj miješalici, a zatim je dodano 7 mL redestilirane vode. Ekstrakt je miješan još 10 minuta te je volumen nadopunjen do 50 mL, a zatim je dodana točno određena masa NA kako bi se postigao određeni udio sukladno planu pokusa prema Box-Behnken dizajnu. Ovako pripremljena smjesa ostavljena je na magnetnoj miješalici 24 h kako bi se postiglo potpuno otapanje NA te njegovo povezivanje s aktivnom tvari (ekstrakt bogat fenolnim spojevima). Na dan inkapsulacije otopljen je bezvodni CaCl_2 u prahu u 300 mL redestilirane vode u određenim koncentracijama prema Box-Behnken dizajnu.

Inkapsulacija je provedena pomoću šprice sa iglom otvora promjera 0,9 mm kapanjem otopine ekstrakta i omotača u otopinu CaCl_2 principom „kap po kap“, a nakon inkapsulacije hidrogelovi su se umrežavali točno određeno vrijeme prema zadanim uvjetima po Box-Behnken dizajnu. Proizvedeni hidrogelovi filtrirani su na naboranom filter papiru (Munktell 21/N). Na površini hidrogelova zaostaju slobodni ioni kalcija koji se tijekom inkapsulacije nisu umrežili te ih je potrebno isprati pa su zbog toga hidrogelovi, dva puta, ispirani sa 200 mL redestilirane vode. Nakon filtriranja i ispiranja, u otopini CaCl_2 i vodi zaostaloj od ispiranja određena je

koncentracija UF-a prema prethodno opisanoj metodi u **poglavlju 3.3.2.2.** te je izračunata učinkovitost inkapsulacije (*Encapsulation Efficiency, EE*) ionskim geliranjem (EE_{IG}) prema izrazu (3.26):

$$EE_{IG} (\%) = \frac{m_A - m_B}{m_A} \cdot 100 \quad (3.26)$$

gdje je: m_A – masa ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu pripremljenom za inkapsulaciju (mg) i m_B – masa ukupnih fenolnih spojeva u otopini za umrežavanje i vodi zaostaloj nakon ispiranja hidrogelova (mg). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

Na temelju dobivenih rezultata za EE_{IG} pomoću numeričke optimizacije pomoću programa Design Expert 12 određeni su optimalni uvjeti inkapsulacije (maseni udio NA = 3 %, koncentracija CaCl_2 = 0,25 M te vrijeme umrežavanja = 10 min) ionskim geliranjem koji su korišteni u daljnjim eksperimentima.

3.3.4.2. Ionsko geliranje pomoću inkapsulatora

Pri utvrđenim optimalnim uvjetima inkapsulacije provedena je inkapsulacija ekstrakta tropa grožđa CS korištenjem inkapsulatora sa različitim omotačima prirodnog porijekla: NA, maltodekstrin dekstroznog ekvivalenta 4 – 7 (MDI), maltodekstrin dekstroznog ekvivalenta 16,5 – 19,5 (MDh), guma tragacanth (GT), guma arabika (GA), želatina (ŽEL) i kitozan (KZ). Prilikom inkapsulacije, NA je korišten kao temeljni omotač kojem su dodavani drugi omotači u svrhu ispitivanja utjecaja dodatnih omotača na EE i svojstava inkapsulata: geometrijske parametre (veličina i oblik), teksturu, morfologiju, kristaličnost, odnosno amorfnost.

Postupak

Suhi koncentrirani ekstrakt tropa grožđa (~ 1,0 g) otopljen je u 20,8 mL 30 %-tne vodene otopine etanola na magnetnoj miješalici tijekom 30 minuta, a zatim je dodana destilirana voda (79,2 mL) i smjesa je miješana još sat vremena. Smjesa je potom centrifugirana na $11\,000 \times g$ tijekom 5 minuta te je odvojen tekući ekstrakt. Dio tekućeg ekstrakta (oko 1,5 mL) odvojen je za određivanja koncentracije UF-a, UFL-a, UPA i pojedinačnih fenolnih spojeva uključujući i antocijane, a ostatak (90 mL) je korišten za inkapsulaciju.

U 90 mL pripremljenog tekućeg ekstrakta dodan je korišteni omotač/i (**Tablica 3.6**) te je smjesa ostavljena na magnetnoj miješalici 24 h. Prije inkapsulacije pripremljena je otopina za umrežavanje tako da je u 300 mL destilirane vode otopljen bezvodni CaCl_2 (0,25 M).

Inkapsulacija je provedena korištenjem inkapsulatora Büchi B-390 (**Slika 3.2**) pri slijedećim uvjetima:

- frekvencija 140 Hz,
- napon elektrode 750 V,
- promjer mlaznice 300 μm , a
- dok tlak je ovisio o korištenom omotaču odnosno omotačima.

Tablica 3.6 Vrsta i maseni udio omotača primijenjenih za inkapsulaciju ekstrakta tropa grožđa metodom ionskog geliranja

Oznaka	Omotač/i	Koncentracija (% w/v)
NA	natrij alginat	3
NA-MDI	natrij alginat	3
	maltodekstrin (DE 4 – 7)	1,2
NA-MDh	natrij alginat	3
	maltodekstrin (DE 16,5 – 19,5)	1,2
NA-GT	natrij alginat	3
	guma tragacanth	0,15
NA-GA	natrij alginat	3
	guma arabika	1,6
NA-ŽEL	natrij alginat	3
	želatina	5

Proizvedeni hidrogelovi su se umrežavali u otopini CaCl_2 tijekom 10 minuta te je ponovljen prethodno opisani postupak filtriranja i ispiranja hidrogelova.



Slika 3.2 Uređaj za provedbu inkapsulacije metodom ionskog geliranja – Inkapsulator Büchi B-390

Kitozan (KZ) je također upotrebljen za inkapsulaciju ekstrakta tropa grožđa, ali nije dodavan u ekstrakt već je korišten na dva različita načina:

- 1) *oblaganje* – KZ je dodavan u otopinu CaCl_2 i
- 2) *uranjanje* – otopina KZ je zasebno pripremljena i u nju su naknadno uranjani formirani hidrogelovi.

Korištene koncentracije KZ-a prikazane su u **Tablici 3.7** U slučaju oblaganja s obzirom na to da se KZ ne otapa u vodi već u kiselim medijima, CaCl_2 otapan je u 300 mL 1 %-tne ledene octene kiseline u koncentraciji 0,25 M te je u njega dodavan KZ. Otopina CaCl_2 i KZ-a miješala se 24 h prije uporabe kako bi se omogućilo potpuno otapanje KZ-a. Ekstrakt je pripremljen sa NA kao omotačem te su se alginatni hidrogelovi umrežavali u otopini CaCl_2 i KZ-a 10 min. Nakon inkapsulacije proveden je postupak pranja i filtriranja hidrogelova prema ranije opisanom postupku. U slučaju uranjanja hidrogelova u KZ, inkapsulacija ekstrakata pomoću NA uključivala je umrežavanje u otopini CaCl_2 tijekom 10 min te filtriranje. Nakon toga hidrogelovi su preneseni u 300 mL otopine KZ-a pripremljene u 1 %-tnoj octenoj kiselini (KZ je pripremljen otapanjem u octenoj kiselini tijekom 24 h uz miješanje). Hidrogelovi su se kontinuirano miješali u otopini KZ-a 10 min te je nakon toga proveden postupak filtriranja i ispiranja sa 2 x 200 mL redestilirane vode.

Nakon provedbe inkapsulacije, određena je EE_{IG} te je provedena karakterizacija hidrogelova opisana u **poglavlju 3.3.7**.

Tablica 3.7 Metode primjene i koncentracije kitozana za inkapsulaciju ekstrakta tropa grožđa

Metoda	Oznaka	Koncentracija KZ (%, w/v)
<i>Oblaganje</i>	NA/1,5KZ	1,5
	NA/1,0KZ	1,0
	NA/0,5KZ	0,5
<i>Uranjanje</i>	NA(1,5KZ)	1,5
	NA(1,0KZ)	1,0
	NA(0,5KZ)	0,5

3.3.4.3. Stabilizacija hidrogelova sušenjem

Hidrogelovi, proizvedeni metodom ionskog geliranja, su nestabilni zbog visokog udjela vode i skloni su kontaminaciji i kvarenju. Također, inkapsulirani ekstrakti su bogati fenolnim spojevima koji su podložni degradaciji uslijed vanjskih utjecaja (svjetlost, kisik, temperatura, itd.) te ih je potrebno stabilizirati za potrebe daljnjih analiza. U tu svrhu provedeno je sušenje hidrogelova trima metodama kako slijedi:

- 1) *sušenje na zraku* – hidrogelovi su postavljeni na staklene Petrijeve posude tako da se ne dodiruju te su sušeni 24 sata pri sobnoj temperaturi,
- 2) *sušenje pod sniženim tlakom* – hidrogelovi su u Petrijevim posudama, postavljeni tako da se ne dodiruju, sušeni u prethodno zagrijanom vakuum sušioniku na 50 °C pod sniženim tlakom ($p = 300$ mbar) u trajanju od 5 do 8 sati ovisno o uzorku,
- 3) *sušenje zamrzavanjem (liofilizacijom)* – prethodno zamrznuti hidrogelovi na -80 °C sušeni su u liofilizatoru na -83 °C, pod sniženim tlakom ($p = 0,250$ mbar) u trajanju od 24 – 72 sata ovisno o uzorku.

Nakon sušenja kao i kod hidrogelova provedena je karakterizacija suhih inkapsulata (**poglavlje 3.3.7.**) radi usporedbe utjecaja metode sušenja hidrogelova na ispitivana svojstva inkapsulata.

3.3.5. Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa sušenjem zamrzavanjem

Sušenje zamrzavanjem, odnosno liofilizacijom, fizikalna je metoda inkapsulacije te višefazni proces koji se sastoji od zamrzavanja, sublimacije (primarnog sušenja), desorpcije (sekundarnog sušenja) i konačnog sušenja, što rezultira suhim materijalom u obliku praha.

Postupak

Otopina suhog ekstrakta i omotača prije inkapsulacije ovom metodom pripremana je na isti način kao što je opisano u **poglavlju 3.3.4.2.** Kod ove metode inkapsulacije kao omotači korišteni su NA, NA-GA i NA-ŽEL u masenim udjelima navedenim u **Tablici 3.6.**

Nakon otapanja omotača 24 h, otopina ekstrakta i omotača je prenesena u tikvice sa okruglim dnom te je provedeno otparavanje prisutnog etanola na rotavaporu ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 48\text{ mbar}$, $t = 10 - 20\text{ min}$). Zatim je ugušćena otopina tekućeg ekstrakta i omotača prelivena u plastične Petrijeve posude na koje je stavljen poklopac te su uzorci zamrznuti preko noći na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Također, dan prije provedbe inkapsulacije, plitice liofilizatora su zamrznute na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pripremljeni uzorci stavljeni su na zamrznute plitice postavljene na postolje liofilizatora, spuštenu je komora te je započet program sušenja zamrzavanjem. Tijekom procesa, temperatura unutar komore iznosila je $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$, a sniženi tlak je iznosio $0,250\text{ mbar}$. Ovisno o uzorku, inkapsulacija sušenjem zamrzavanjem provedena je od 24 do 48 sati. Po završetku procesa, uzorci su usitnjeni u tarioniku s tučkom, a dobiveni prahovi su čuvani su u plastičnim vrećicama sa zatvaračem u eksikatoru.

Nakon inkapsulacije određena je koncentracija fenolnih spojeva koja se nalazi u praškastim inkapsulatima (*Content of Total Phenols, CPC*) te koncentracija fenolnih spojeva na površini (*Surface Phenols Content, SPC*) inkapsulata prema metodi koju su opisali Vergara i sur. (2014) uz određene modifikacije. U 50 mg uzorka dodano je 1 mL otopine etanol : octena kiselina : voda ($50 : 8 : 42$, v/v/v) te je uzorak promiješan 1 min na vorteksu, a zatim centrifugiran na $14\,000 \times g$ 2 min . Supernatant je zatim odvojen i u njemu je određena *CPC* prema metodi opisanoj u **poglavlju 3.3.2.2.** Na isti način provedeno je i određivanje *SPC*, ali je u 50 mg uzorka dodano 1 mL otopine etanol : metanol ($50 : 50$, v/v).

Prema dobivenim rezultatima, izračunata je *EE* sušenjem zamrzavanjem (EE_{SZ}) prema izrazu (3.27):

$$EE_{SZ} (\%) = \frac{CPC - SPC}{CPC} \cdot 100 \quad (3.27)$$

gdje je: *CPC* – maseni udio ukupnih fenolnih spojeva koja se nalazi u inkapsulatima ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{UZ}}$), a *SPC* – maseni udio fenolnih spojeva na površini inkapsulata ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{UZ}}$).

3.3.6. Inkapsulacija ekstrakata tropa grožđa sušenjem raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je fizikalna tehnika inkapsulacije gdje se otopina, koja sadrži aktivnu tvar i omotač, raspršuje kroz mlaznicu u sitne kapljice iz kojih se isparava otapalo, a osušene čestice u obliku praha se skupljaju u ciklonu (Ozkan i sur., 2019).

Postupak

Provedena je konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija prema uvjetima opisanim u poglavlju 3.3.2.1. Tekući ekstrakt je uparen do pola na rotavaporu ($p = 48$ mbar, $T = 50$ °C), kako bi se uklonio etanol, i potom se koristio za inkapsulaciju metodom sušenja raspršivanjem. Miješano je 150 mL poluuparenog ekstrakta s 250 mL destilirane vode te su dodani omotači koji su se pokazali kao najprikladnijima za inkapsulaciju ionskim geliranjem kako slijedi NA, NA-GA i NA-ŽEL, a njihove konačne koncentracije u otopini prikazane su u **Tablici 3.8**.

Tablica 3.8 Vrsta i maseni udio omotača primijenjenih za inkapsulaciju ekstrakta tropa grožđa metodom sušenja raspršivanjem

Oznaka	Omotač/i	Koncentracija (%, w/v)
NA	natrij alginat	1
NA-GA	natrij alginat	1
	guma arabika	0,53
NA-ŽEL	natrij alginat	1
	želatina	1,67

Poluupareni ekstrakt s vodom i omotačem/ima miješao se na magnetnoj miješalici tijekom 24 h prije provedbe sušenja raspršivanjem. Pripremljena smjesa sušena je raspršivanjem u uređaju B-290 kroz mlaznicu od 1,5 mm pri temperaturi ulaznog zraka od 180 °C. Brzina pumpanja postavljena je na 25 %, s približnim protokom zraka od 600 L/h. Dobiveni inkapsulati (prah) su sakupljeni u tikvici za odvajanje, a zatim pohranjene u zatvorenim spremnicima za uzorke na 4 °C u mraku do daljnje analize.

Nakon inkapsulacije sušenjem raspršivanjem u dobivenim inkapsulatima (prahovima) određena je koncentracija *CPC* i *SPC* na isti način kako je to opisano u prethodnom poglavlju (3.3.5) za sušenje zamrzavanjem. Isto tako učinkovitost inkapsulacije sušenjem raspršivanjem (EE_{SR}) određena je na isti način kao i kod inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem odnosno prema **izrazu (3.27)**.

3.3.7. Karakterizacija inkapsulata

U ovom radu pojam inkapsulati odnosi se na hidrogelove dobivene ionskim geliranjem i suhe inkapsulate dobivene sušenjem hidrogelova na zraku, pod vakuumom i zamrzavanjem. Osim toga druge dvije metode inkapsulacije (inkapsulacija sušenjem zamrzavanjem i inkapsulacija sušenjem raspršivanjem) rezultirale su također suhim inkapsulatima u obliku praha.

Hidrogelovima su ispitana fizikalno-kemijska, strukturna i funkcionalna svojstva (veličina, oblik, tekstura, EE_{IG}) u ovisnosti od primijenjenog omotača.

Svim suhim inkapsulatima provedena je karakterizacija kao i kod hidrogelova te je dodatno ispitana njihova morfologija, te kristaličnost odnosno amorfnost inkapsulata te termofizikalna svojstva u ovisnosti o primijenjenom omotaču i ekstraktu. Osim toga, praćen je profil otpuštanja fenolnih spojeva iz suhih inkapsulata tijekom simulirane probave *in vitro* bez i sa prisustvom enzima te je određena biodostupnost fenolnih spojeva u ovisnosti o primijenjenoj metodi inkapsulacije, omotaču i ekstraktu te njihovoj interakciji.

3.3.7.1. Određivanje geometrijskih parametara inkapsulata računalnom analizom slike

Geometrijske značajke uzoraka – hidrogelova i suhih inkapsulata – određeni su računalnom analizom slike. Pomoću skenera EPSON V500 Photo, proveden je prihvrat i digitalizacija slike u rezoluciji 800 dpi, dubini boje 24 bit u sRGB modelu i TIFF formatu. Na staklenu Petrijevu zdjelicu promjera 5 cm složeno je 10 hidrogelova/suhih inkapsulata pazeći pri tome da se ne dodiruju. Zatim je Petrijeva zdjelica s uzorcima postavljena na skener koji je smješten u tamnu komoru kako bi se eliminirao utjecaj vanjskog svjetla te smanjila mogućnost nastanka pogreške pri skeniranju. Nakon skeniranja slike su obrađene u programu ImageJ (verzija 1.59g, Wayne Rasband, NIMH, Maryland, SAD) (Ferreira i Rasband, 2012). Očitane su dvije skupine parametara – parametri veličine (**Tablica 3.9**) i oblika (**Tablica 3.10**). Dobiveni rezultati mjerenja veličine uzoraka, iz piksela pretvoreni su u milimetre s obzirom na poznate vrijednosti razlučivosti skenera u dpi jedinicama. Odnosno, skenirano je ravnalo te je izračunata vrijednost piksela iz milimetara.

Tablica 3.9 Parametri veličine uzorka i njihovi opisi

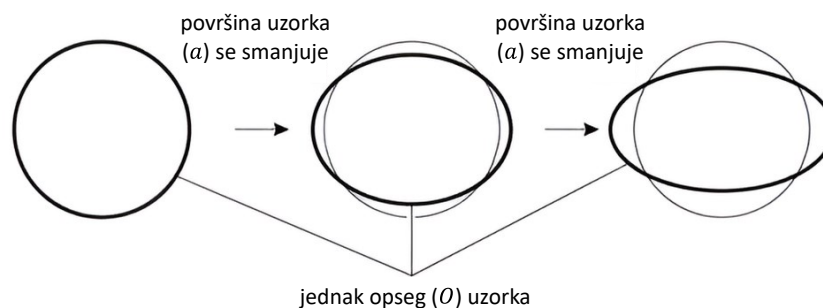
Parametri veličine	Opis parametra
površina (<i>area</i> , <i>a</i>), mm ²	područje odabira uzorka na fotografiji
opseg (<i>perimeter</i> , <i>O</i>), mm	duljina vanjske granice uzorka
duljina (<i>max Feret</i> , <i>Feret_{MAX}</i>), mm	najduža os uzorka
širina (<i>min Feret</i> , <i>Feret_{MIN}</i>), mm	najkraća os uzorka

Tablica 3.10 Parametri oblika uzorka i njihov opis te formule za njihov izračun

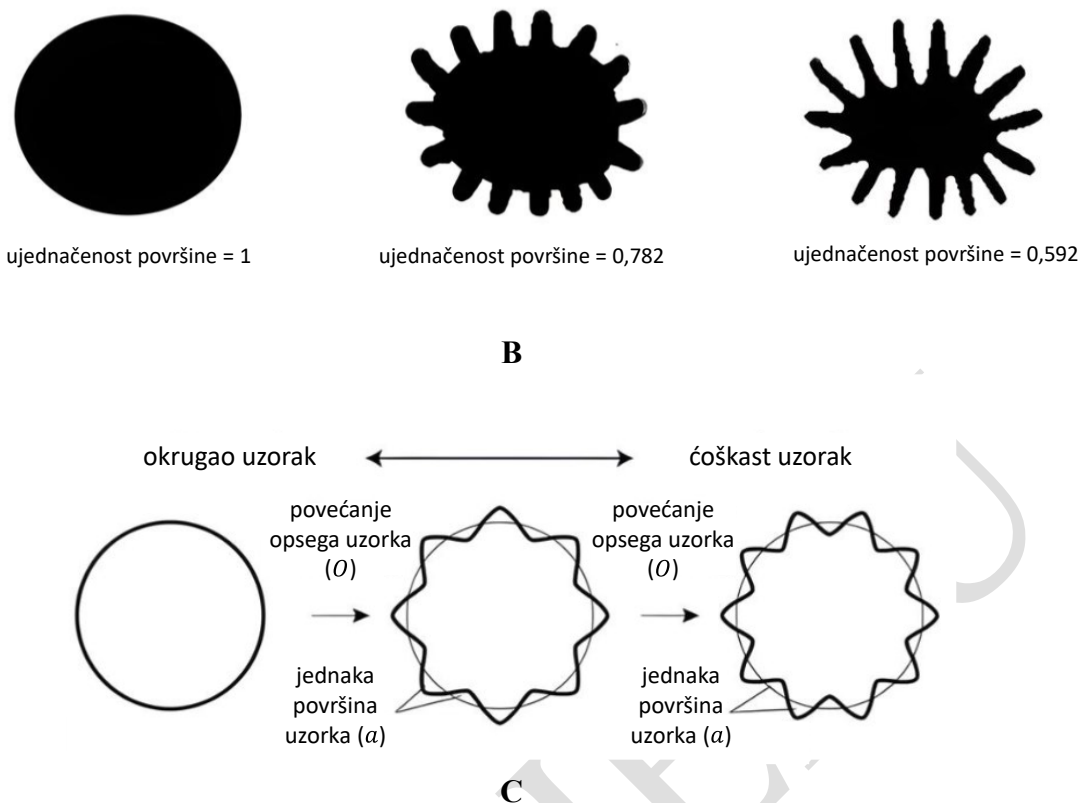
Parametri oblika	Izračun	Opis parametra
kružnost (<i>circularity</i>)	$\frac{4 \cdot \pi \cdot a}{O^2}$	mjera odstupanja uzorka od savršenog kruga
zaobljenost (<i>roundness</i>)	$\frac{4 \cdot a}{\pi \cdot \text{Feret}_{\text{MAX}}^2}$	zakrivljenost uglova i bridova uzorka
ujednačenost površine (<i>solidity</i>)	$\frac{a}{\text{konveksna površina}^*}$	mjera kompaktnosti uzorka

*konveksna površina - krivulja kojom se opisuje vanjska površina uzorka – hidrogela ili suhog inkapsulata

Kružnost (*circularity*) daje uvid koliko oblik uzorka odstupa od pravilnog kruga, a vrijednosti se kreću u rasponu od 0 do 1, pri čemu vrijednosti bliže 1 ukazuju da je oblik uzorka bliži savršenom krugu. S druge strane, kako se vrijednosti smanjuju prema 0, oblik uzorka je izduženiji i sličniji obliku elipse (**Slika 3.3 A**).



A



Slika 3.3 Ilustracija izmjerenih parametara oblika uzorka (A) kružnost, (B) ujednačenost površine i (C) zaobljenost

Vrijednost ujednačenosti površine uzorka (*solidity*) također se kreće u rasponu od 0 do 1 gdje vrijednosti manje od 1 ukazuju da je ispitivani uzorak nepravilnog oblika i da sadrži šupljine, a vrijednost 1 označava kompaktan uzorak (**Slika 3.3 B**).

Zaobljenost (*roundness*) definira se kao funkcija površine uzorka i duljine najduže izračunate osi uzorka, a predstavlja zakrivljenost rubova i obrisa ispitivanog uzorka (**Slika 3.3 C**). Vrijednosti parametara izračunati su pomoću softvera ImageJ User Guide - IJ 1.46r. Mjerenja su provedena u tri paralele te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost mjerenja $\pm$ SD.

3.3.7.2. Ispitivanje teksturalnih parametara inkapsulata

Analiza profila teksture (*Texture Profile Analysis*, TPA) hidrogelova i suhih inkapsulata provedena je korištenjem uređaja TA.XTplus Texture Analyzer. Pojedinačni hidrogel podvrgnut je dvostrukoj kompresiji od 50 % s odgodom od 2 s između kompresija i ispitnom brzinom od 0,5 mm/s. Korištena je aluminijska cilindrična sonda promjera 10 mm. Vrijednost tvrdoće (N), određena iz TPA krivulja, a očitana je nakon 2 s kompresije na točki na krivulji gdje je hidrogel komprimiran 1 mm. Pojedinačni suhi inkapsulat komprimiran je istom sondom do tlačnog opterećenja od 20 % pri ispitnoj brzini od 0,1 mm/s, a tvrdoća (N) je određena kao

maksimalna visina vrha. Procijenjena je tekstura deset hidrogelova/inkapsulata iz svake skupine uzoraka te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

3.3.7.3. Ispitivanje morfologije inkapsulata pretražnim elektronskim mikroskopom

Morfologija suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem, prahova dobivenih inkapsulacijom sušenjem zamrzavanjem te prahova dobivenih inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem, analizirana je pretražnim elektronskim mikroskopom (*Scanning Electron Microscope*, SEM) pri naponu 10 kV. Uzorci su prije analize obloženi tankim zlatno-paladijevim filmom pomoću uređaja za nanošenje filma prskanjem.

3.3.7.4. Ispitivanje toplinskih svojstva uzoraka diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom

Ispitivanje toplinskih svojstava uzoraka (omotača, ekstrakata i suhih inkapsulata) provedeno je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) koja se temelji na analiziranju razlike toplinskog toka između referentnog materijala i uzorka uporabom keramičkih senzora visoke osjetljivosti.

Postupak

U male aluminijske posudice izvagano je 3 – 5 mg uzorka u obliku praha te su posudice zatvorene aluminijskim poklopcem, na kojem su prethodno probušene dvije rupice, pomoću preše za brtvljenje. Uzorci su zatim stavljeni u komoru za mjerenje DSC uređaja te su postavljeni uvjeti mjerenja: temperaturni interval 25 – 300 °C pri brzini zagrijavanja od 10 °C/min, uz konstantan protok argona od 150 mL/min. Kao referentni materijal je upotrijebljena prazna aluminijska posudica. Dobivene DSC krivulje analizirane su pomoću STARe 9.30 softvera (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Njemačka).

Ovom metodom analizirani su korišteni omotači za inkapsulaciju (NA, GA, ŽEL), suhi ekstrakti tropa grožđa (CS, CF i M), suhi inkapsulati dobiveni liofilizacijom hidrogelova proizvedenih ionskim geliranjem (ovi uzorci su usitnjeni prije analize u tarioniku), suhi inkapsulati (prahovi) dobiveni inkapsulacijom sušenjem zamrzavanjem i inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem.

3.3.7.5. Ispitivanje kristaličnosti uzoraka rendgenskom difrakcijom praha

Kristalna struktura uzoraka karakterizirana je pomoću sustava za rendgensku difrakciju praha, (*X-Ray Powder Diffraction*, XRPD). Metoda se temelji na principu da se zrake rendgenskog

zračenja usmjeravaju na ravnu površinu usitnjenog uzorka smještenog na nosaču. Rotacijom detektora i uzorka mijenja se difrakcijski kut te se mjeri intenzitet difraktiranog rendgenskog zračenja s uzorka u ovisnosti o kutu difrakcije (Bunaciu i sur., 2015).

Postupak

Ovom metodom analizirani su suhi ekstrakti tropa grožđa, korišteni omotači, liofilizirani hidrogelovi dobiveni ionskim geliranjem (usitnjeni u tarioniku), prahovi dobiveni inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem te prahovi dobiveni inkapsulacijom liofilizacijom. Na pločice je stavljen uzorak u obliku praha pazeći pri tome da njegova površina bude ravna. Pločica s uzorkom postavljena je na predviđeno mjesto, uređaj je zatvoren i pokrenuta je rotacija. Zatim je primijenjeno monokromatizirano $\text{CuK}\alpha$ rendgensko zračenje ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) te su uzorci zračeni uz napon od 40 kV i jakost struje od 40 mA. Difraktogrami su snimljeni u rasponu kutova 2θ od 3° do 40° s pomoću VÅNTEC-1 detektora. Daljnja obrada rezultata, zaglađivanje krivulja, skidanje $\text{K}\alpha_2$ i uklanjanje pozadine, provedeni su pomoću softvera DIFFRAC plus EVA (Karlsruhe, Njemačka). Prije provedbe analiza, uređaj je kalibriran pomoću referentnog uzorka silicij dioksida.

3.3.7.6. Analiza veličine inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem

Analiza veličine čestica provedena je pomoću Fiji (ImageJ) softvera (ImageJ 1,54 g, Java 11.8.0_322) kod inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem. SEM slike su kalibrirane na temelju dane skale od $100 \mu\text{m}$. Izmjerena je projicirana 2D površina svake čestice, a ekvivalentni kružni promjer izračunat je pomoću izraza (3.28):

$$d (\mu\text{m}) = 2x \sqrt{\frac{\text{Površina}}{\pi}} \quad (3.28)$$

gdje je: d – promjer čestice (μm), dok „Površina“ predstavlja 2D projiciranu površinu čestice u μm^2 .

Raspodjela veličine čestica izražena je u terminima D10, D50 (medijan), D90 i srednjeg promjera $\pm$ SD. Raspon veličine za svaki uzorak također je zabilježen kako bi se procijenila ujednačenost veličine čestica.

3.3.8. Simulacija probave u *in vitro* uvjetima

Simulirana probava u *in vitro* uvjetima provedena je bez prisustva i sa prisustvom probavnih enzima prema standardizanoj INFOGEST metodi (Brodkorb i sur., 2019) koja je prilagođena eksperimentalnim uvjetima ovog rada. Probava inkapsulata bez prisustva enzima provedena je za potrebe opisivanja kinetike otpuštanja fenolnih spojeva na osnovi čega su, uz fizikalno-kemijsku i funkcionalnu karakterizaciju inkapsulata, odabrani najprikladniji omotači, odnosno kombinacija omotača za inkapsulaciju, i način stabilizacije hidrogelova u slučaju ionskog geliranja. Simulirana probava ekstrakata tropa grožđa i inkapsulata pripremljenih sa odabranim omotačima provedena je uz prisustvo enzima s ciljem određivanja biodostupnosti fenolnih spojeva u probavnom traktu.

Prije provedbe simulirane probave pripremljene su osnovne otopine elektrolita u redestiliranoj vodi prema **Tablici 3.11**.

Tablica 3.11 Prikaz pripreme osnovnih otopina elektrolita (soli) potrebnih za pripremu simuliranih probavnih otopina

	<i>C</i> OSNOVNA OTOPINA (mol/L)	<i>m</i> (g)	<i>V</i> _{H₂O} (mL)
KCl	0,5	1,865	50
KH ₂ PO ₄	0,5	3,4	50
NaHCO ₃	1	8,4	100
NaCl	2	5,85	50
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	1,525	50
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	2,4	50
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0,3	2,205	50

Sve osnovne otopine su čuvane na -20 °C, a najduže godinu dana osim otopine natrijevog hidrogen karbonata (NaHCO₃) koja je nakon pripreme filtrirana preko filter papira i čuvana na 2 – 5 °C najduže mjesec dana.

Osnovne otopine korištene su za pripremu otopina koje oponašaju probavne tekućine u ustima (*Simulated Salivary Fluid*, SSF), želudcu (*Simulated Gastric Fluid*, SGF) te u crijevima (*Simulated Intestinal Fluid*, SIF). Svaka od tri simulirane probavne otopine pripremljena je u određenim koncentracijama na način da su pomiješani određeni volumeni osnovnih otopina elektrolita i nadopunjeni s destiliranom vodom do 400 mL pri čemu su dobivene koncentrirane probavne otopine (1,25 x veća koncentracija nego u konačnom volumenu otopine od 500 mL) koje su kasnije nakon dodatka enzima, žučnih soli, vode i otopine CaCl₂(H₂O)₂ tijekom provedbe probave rezultirale koncentracijom elektrolita (soli) u konačnoj probavnoj smjesi koja

odgovara koncentracijama navedenim u **Tablici 3.12**. Otopina $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ je dodavana izravno tijekom procesa simulirane probave, a ne odmah tijekom pripreme probavnih otopina zbog toga što može uzrokovati taloženje soli.

Tablica 3.12 Sastav probavnih otopina koje simuliraju oralnu (SSF – *Simulated Salivary Fluid*), želučanu (SGF – *Simulated Gastric Fluid*) i crijevnu (SIF – *Simulated Intestinal Fluid*) fazu sa pripadajućim volumenima otopina soli potrebnim za pripremu 500 mL pojedine simulirane probavne otopine koja sadrži navedene koncentracije soli u gotovim otopinama

	SSF		SGF		SIF	
	<i>c</i> (mM)	<i>V</i> (mL)	<i>c</i> (mM)	<i>V</i> (mL)	<i>c</i> (mM)	<i>V</i> (mL)
KCl	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH_2PO_4	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO_3	13,6	6,8	25	25	85	42,5
NaCl	-	-	47,2	47,2	38,4	9,6
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	0,15	0,5	0,1	0,1	0,33	1,1
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0,06	0,06	0,5	0,5	-	-
$\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$	1,5	0,025	0,15	0,005	0,6	0,04

Pripremljene koncentrirane probavne otopine čuvane su na $-20\text{ }^\circ\text{C}$, a najduže ih je moguće čuvati do godinu dana, u volumenima potrebnim za provedbu pojedine faze simulirane probave. Prije uporabe simuliranih probavnih otopina potrebno ih je odmrznuti i zagrijati na $37\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.8.1. *In vitro* otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva

U čašu je izvagan uzorak (100 mg neinkapsuliranog ekstrakta; 100 mg suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem ili 200 mg inkapsulata/praha dobivenog sušenjem raspršivanjem ili zamrzavanjem) te je dodano 4 mL SSF otopine i $25\text{ }\mu\text{L}$ $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$. Izmjeren je pH otopine, koji treba iznositi $7 \pm 0,1$, a ukoliko je potrebno, pH je podešen odgovarajućom otopinom (1 M HCl ili 1 M NaOH). Uzimajući u obzir volumen potrebne otopine za podešavanje pH, ukupni volumen je nadopunjen do 10 mL redestiliranom vodom. Čaša s otopinom je zatim stavljena na zagrijanu magnetnu miješalicu ($37\text{ }^\circ\text{C}$) gdje je provođeno miješanje otopine pri 200 rpm. Oralna faza (OP – *Oral Phase*) trajala je 3 minute, a zatim je odvojeno 2 mL alikvota otopine za analizu te je 2 mL čiste SSF otopine dodano u glavnu masu otopine.

Nakon završene OP, nastavljena je želučana faza (GP – *Gastric Phase*) dodavanjem 8 mL SGF otopine te $5\text{ }\mu\text{L}$ $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, a pH je podešen na 3. Zatim je dodana redestilirana voda do ukupnog volumena 20 mL, uzimajući u obzir volumen 1 M HCl-a za podešavanje pH vrijednosti. Čaša je vraćena na magnetnu miješalicu, a otpuštanje je nastavljeno kroz 120 min.

U određenim vremenskim intervalima (6.; 8.; 23.; 48.; 63. i 123. min) provedeno je uzorkovanje na isti način kao i u OP – odvojeno je 2 mL alikvota otopine za analizu, a pri tome je isti volumen SGF otopine vraćen u glavnu masu otopine.

U čašu je, nakon GP, dodano 16 mL SIF otopine i 40 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ kako bi se nastavila crijeva faza (IP – *Intestinal Phase*) probave. Podešen je pH na 7 s 1 M NaOH, a zatim je dodana redestilirana voda do ukupnog volumena 40 mL. Vrijeme trajanja IP je 120 minuta, a uzorkovanje je provedeno na isti način kao i tijekom želučane faze (126.; 128.; 143; 168.; 183.; 243. min).

U uzorcima odvojenima tijekom provedbe *in vitro* otpuštanja, određene su koncentracije UF-a (prema metodi opisanoj u **poglavlju 3.3.2.2.**) u tri paralele, a zatim su rezultati prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.

Uporaba karbonatnih soli u probavnim otopinama zahtijeva korištenje zatvorenih spremnika s ograničenim prostorom iznad otopina jer se u otvorenim posudama oslobađa CO_2 što može uzrokovati porast pH vrijednosti. Zbog toga je tijekom cijelog otpuštanja čaša bila poklopljena satnim staklom.

3.3.8.2. Određivanje biodostupnosti fenolnih spojeva

U ovom radu ispitana je biodostupnost fenolnih spojeva neinkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa (NIE) i inkapsulata nakon *in vitro* simulirane probave uz prisustvo enzima pepsina i pankreatina te ekstrakta žuči.

Prije početka simulacije probave, ispitana je aktivnost korištenih enzima i određena potrebna koncentracija ekstrakta žuči. Također ispitane su količine HCl-a i NaOH potrebne za postizanje ciljanog pH kako bi se izvršila učinkovitija prilagodba pH vrijednosti tijekom izvođenja protokola simulacije probave.

1) Ispitivanje aktivnosti pepsina

Princip: hemoglobin + H_2O $\xrightarrow{\text{pepsin}}$ tirozin sa peptidima topljiv u trikloroetanoj kiselini (TCA)

Definicija jedinice: jedna jedinica je aktivnost enzima koja oslobađa količinu tirozina koja dovodi do promjene apsorbancije od 0,001 po minuti na 280 nm pri pH 2,0 i 37 °C ("Sigma" ili "Anson" pepsin jedinica).

Priprema supstrata: Hemoglobin je pripremljen neposredno prije provedbe testa otapanjem 0,5 g u 20 mL redistirane vode (2 % w/v) te je pH otopine podešen pomoću 300 mM HCl-a na vrijednost 2. Zatim je ukupni volumen otopine hemoglobina nadopunjen do 25 mL redistiranom vodom.

Priprema enzima: Pepsin je otopljen u 10 mM Tris/HCl puferu (pH 6,5) sa NaCl-om u koncentraciji 1 mg/mL. Tris/HCl pufer pripremljen je otapanjem 0,02423 g Tris-a u 150 mM NaCl-u, a zatim je pH pufera podešen na 6,5 pomoću 37 %-tnog HCl-a. Nadalje, neposredno prije analize, otopina pepsina (1 mg/mL) je razrijeđena s 10 mM HCl-om u koncentracijama u rasponu od 5 do 30 µg/mL. Pripremljene otopine pepsina čuvane su na ledu tijekom pripreme.

Test: U 500 µL hemoglobina dodano je 100 µL svake otopine pepsina (5 – 30 µg/mL) i inkubirano 10 min na 37 °C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 1 mL 5 %-ne (w/v) TCA, a zatim su uzorci centrifugirani 30 min na 6 000 ×g na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je očitana na valnoj duljini 280 nm u kvarenim kivetama. Slijepa proba provedena je na isti način, ali je pepsin dodan tek nakon dodavanja TCA. Specifična aktivnost (*S. A.*) pepsina zatim je izračunata prema izrazu (3.29):

$$S. A. (U/mg) = \frac{(A_T - A_{SP}) \cdot 1000}{\Delta t \cdot X} \quad (3.29)$$

gdje je A_T – apsorbancija testne otopine sa enzimom na 280 nm, A_{SP} – apsorbancija slijepe probe na 280 nm, 1000 – faktor razrjeđenja radi pretvorbe jedinica iz µg u mg, Δt – vrijeme trajanja reakcije (10 min) i X – koncentracija pepsina u reakcijskoj smjesi u kiveti (µg/mL).

2) Ispitivanje aktivnosti pankreatina

Princip: TAME + H₂O $\xrightarrow{\text{pankreatin}}$ *p*-toluen-sulfonil-L-arginin + metanol

Definicija jedinice: Jedna jedinica hidrolizira 1 µmol *p*-toluen-sulfonil-L-arginin metil estera (TAME) po minuti pri pH 8,1 i 25 °C.

Priprema supstrata: TAME je pripremljen otapanjem u koncentraciji 10 mM u redistiranoj vodi.

Priprema enzima: Otopine pankreatina pripremljene su otapanjem u 1 mM HCl-u u koncentracijama od 10 do 20 µg/mL.

Test: Neposredno prije analiza pripremljen je 46 mM Tris/HCl pufer otapanjem 0,557244 g Tris-a u 100 mL 11,5 mM CaCl₂ te je pH podešen na 8,1 pomoću HCl-a. U kvarcnu kivetu je zatim dodano 1305 µL ovog pufera i 150 µL supstrata te je smjesa promiješana inverzijom. Nadalje, dodano je 45 µL svake testne otopine enzima te je očitana promjena apsorbancije u vremenu (dA/dt) na 247 nm tijekom 250 sekundi. Za slijepu probu postupak je isti, ali je umjesto enzima dodan isti volumen Tris/HCl pufera. Specifična aktivnost ($S.A.$) pankreatina izračunata je prema izrazu (3.30):

$$S.A. (U/mg) = \frac{(\Delta A_T - \Delta A_{SP}) \cdot 1000 \cdot V_{uk} \cdot l}{\varepsilon \cdot m} \quad (3.30)$$

gdje je ΔA – promjena apsorbancije u vremenu na 247 nm testne otopine (ΔA_T) i slijepe probe (ΔA_{SP}) (1/min), V_{uk} – ukupni volumen reakcijske smjese (1,5 mL), ε – ekstinkcijski koeficijent supstrata na 247 nm (540 mL/µmol·cm), m – masa pankreatina u reakcijskoj smjesi u kiveti (mg) i l – duljina optičkog puta ($l = 1$ cm).

3) Ispitivanje koncentracije ekstrakta žuči

Koncentracija ekstrakta žuči ispitana je pomoću kompleta za fluorimetrijsko određivanje koncentracije žučnih soli (MAK-309, Sigma Aldrich). Princip analize temelji se na reakciji 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaza sa žučnim kiselinama, pretvarajući NAD u NADH, što reducira slijepu probu u visoko fluorescentni produkt. Rezultirajući intenzitet fluorescencije ($\lambda_{ex} = 530$ nm/ $\lambda_{em} = 585$ nm) linearan je s koncentracijom žučne kiseline u uzorku. Analiza je provedena prema uputama za odgovarajući kit (*Bile Acid Assay Kit*).

Nakon ispitivanja aktivnosti enzima, prilagodbe pH vrijednosti i koncentracije ekstrakta žuči, provedena je *in vitro* simulacija probave.

4) Priprema enzima za simuliranu probavu *in vitro*

Enzimi i ekstrakt žuči pripremani su neposredno prije provođenja faze probave u kojoj su korišteni.

Priprema pepsina: Pepsin je pripreman na način da u završnoj otopini koja predstavlja želučanu fazu ima aktivnost 2000 U/mL. Kako bi se to postiglo, na dan simulacije probave i neposredno prije želučane faze, 16 mg pepsina otapano je u 500 µL redestilirane vode. Naime, za svaku

Falcon epruvetu pripremljena je posebna otopina pepsina. Pepsin je odvagano dan prije provedbe *in vitro* simulirane probave i čuvan na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprema pankreatina: Pankreatin je pripreman tako da u crijevnoj fazi ima aktivnost 100 U/mL što je postignuto otapanjem 444,44 mg pankreatina u 5 mL SIF otopine neposredno prije crijevnog faze. Za svaku Falcon epruvetu crijevnog faze tijekom simulirane probave, pripremljena je posebna otopina pankreatina. Kao i pepsin, pankreatin je odvagano dan prije provedbe *in vitro* simulirane probave i čuvan na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprema ekstrakta žuči: Ekstrakt žuči u otopini crijevnog faze treba biti u koncentraciji od 1 mmol/L te je pripreman otapanjem 441,745 mg ekstrakta žuči u 2,5 mL SIF otopine na dan provedbe *in vitro* simulirane probave. Naime, ekstrakt žuči se vrlo teško otapa te je neophodno uračunati potrebno vrijeme njegova otapanja tijekom pripreme. Poput pepsina i pankreatina, ekstrakt žuči odvagano je dan prije provedbe simulirane probave te je čuvan na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5) Postupak simulirane probave *in vitro*

In vitro simulacija probave provedena je u Falcon epruvetama gdje je za određeni vremenski interval korištena zasebna epruveta s uzorkom. Primjerice, ukoliko je uzorak probavne smjese uziman nakon 3, 60 i 120 min simulirane probave, pripremljeno je tri Falcon epruvete (**Slika 3.4**). Probavna smjesa konstantno je miješana pomoću multifunkcionalnog rotatora (orbitalna rotacija 100 rpm, recipročna rotacija 45°) postavljenog u termostatu koji je održavao ujednačenu temperaturu okoline od $37,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

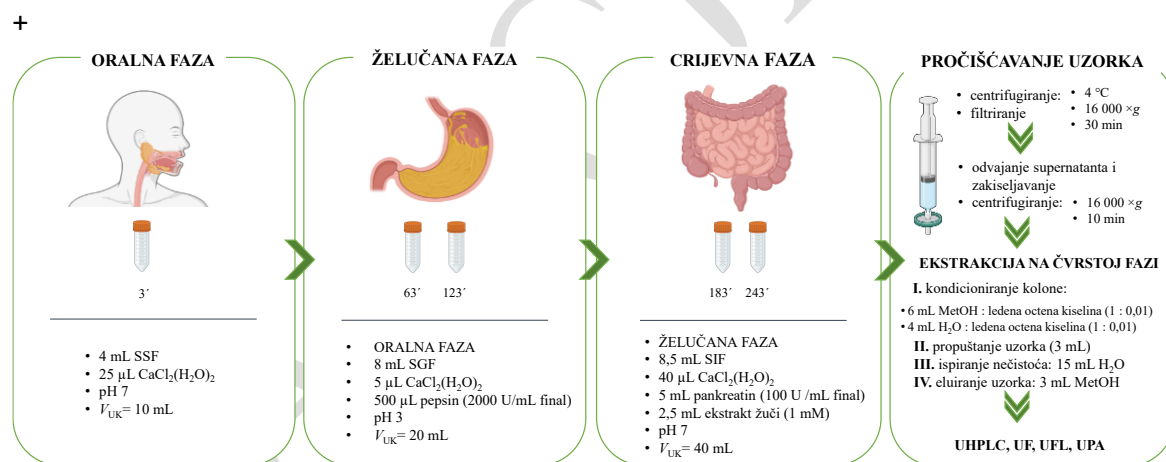
U svaku Falcon epruvetu izvađeno je uzorak, 100 mg suhog ekstrakta, 100 mg liofiliziranih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem ili sušenjem raspršivanjem te 200 mg inkapsulata dobivenog sušenjem zamrzavanjem.

Oralna faza: U Falcon epruvete s uzorcima dodano je 4 mL SSF-a i 25 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$. Zatim je dodano 5,975 mL redestilirane vode kako bi ukupan volumen bio 10 mL. Prema ranije provedenim eksperimentima utvrđeno je da nije potrebno podešavati pH vrijednost. Nakon dodavanja otopina, Falcon epruvete postavljene su na rotator te su se miješale 3 min nakon čega je epruveta, koja je predstavljala oralnu fazu izvađena iz termostata, a ostale su pripremljene za želučanu fazu.

Želučana faza: Nakon završetka oralne faze u Falcon epruvete dodano je 8 mL SGF-a, 5 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ te je pH podešen na 3 dodavanjem 350 μL 1 M HCl-a. Potom je dodano 500 μL

svježe pripremljenog pepsina i 945 μL redestilirane vode kako bi ukupni volumen bio 20 mL. Nakon točno određenog vremenskog perioda (63 i 123 min), iz rotatora i inkubatora je izuzimana Falcon epruveta s uzorkom. Ukupno trajanje želučane faze je 120 min.

Crijevna faza: Crijevna faza započeta je dodavanjem 8,5 mL SIF-a, 40 μL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ te 160 μL 1 M HCl-a za podešavanje pH vrijednosti na 7. Zatim je otopinu dodavano 5 mL pankreatina i 2,5 mL ekstrakta žuči te 3,8 mL redestilirane vode kako bi ukupan volumen bio 40 mL. Kao i u želučanoj fazi, Falcon epruveta s reakcijskom smjesom izuzimana je u određenim vremenskim intervalima iz rotatora (183 i 243 min). Ukupno vrijeme trajanja crijevnog faze je 120 min. Nakon izuzimanja pojedinih Falcon epruveta iz termostata tijekom provedbe *in vitro* simulirane probave, uzorci su odmah centrifugirani 30 min na 16 000 $\times g$ na 4 °C. Zatim je odvojen supernatant koji je filtriran pomoću filtera veličine pora 0,45 μm (Syringe Filter Nylon 25 mm 0,45 μm , Agilent Technologies, SAD) kako bi se odvojili enzimi, ekstrakt žuči i prisutni ostatci inkapsulata ili ekstrakta. Dobiveni filtrat sadrži još uvijek mnogo soli te ga je potrebno pročistiti prije daljnjih analiza, a kao metoda pročišćavanja korištena je ekstrakcija na čvrstoj fazi (*Solid Phase Extraction*, SPE).



Slika 3.4 Shematski prikaz provedbe procesa *in vitro* simulirane probave i pročišćavanja dobivenih uzoraka

6) Pročišćavanje uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Metoda SPE koristi se za selektivno izdvajanje ciljanih komponenata iz tekućih uzoraka prolaskom kroz kolonu s imobiliziranom čvrstom fazom koja adsorbira te komponente, dok ostale komponente prolaze kroz nju. Postupak obuhvaća četiri glavna koraka: pripremu (kondicioniranje) kolone s odgovarajućim otapalima kako bi se čvrsta faza aktivirala za adsorpciju; propuštanje uzorka, gdje ciljane komponente ostaju adsorbirane na čvrstu fazu;

ispiranje kolone radi uklanjanja neadsorbiranih ili slabije adsorbiranih komponenata; i eluciju (desorpciju), gdje se ciljane komponente oslobađaju s čvrste faze upotrebom prikladnih organskih otapala (Buszewski i Szultka, 2012).

Priprema otopina za kondicioniranje kolona

Za kondicioniranje kolona korištene su dvije otopine – otopina ledene octene kiseline i metanola te otopina ledene octene kiseline i vode. Otopina metanola i ledene octene kiseline (1 : 0,01) pripremljena je u odmjerenoj tikvici od 1 L tako što je zbog egzotermne reakcije najprije u manji volumen metanola (~ 20 mL) dodano 10 mL ledene octene kiseline te je tikvica nadopunjena metanolom do oznake. Na isti način pripremljena je i otopina vode i ledene octene kiseline (1 : 0,01).

Postupak

SPE je provedena uporabom sustava za ekstrakciju na čvrstoj fazi pod vakuumom koji se uspostavlja pomoću vakuum pumpe. Prije provedbe SPE-a, kolone (Superclean™, LC-18, 100 mg, 1 mL) koje sadrže imobiliziranu fazu (oktadecil silicij dioksid) su kondicionirane sa 6 mL otopine metanola i ledene octene kiseline (1 : 0,01), a zatim s još 4 mL otopine vode i ledene octene kiseline (1 : 0,01).

U 4 mL filtrata, dobivenog nakon *in vitro* simulirane probave, dodano je 80 µL ledene octene kiseline te je uzorak centrifugiran 10 min na 16 000 ×g. Potom je 3 mL supernatanta propušteno kroz kondicioniranu kolonu te je kolona isprana sa 15 mL vode. Na ovaj način omogućeno je ispiranje kolone, ali također i ispiranje soli koje se nalaze u uzorku. Nakon ispiranja, uzorak je eluiran s kolone pomoću 3 mL metanola. U ovim uzorcima su zatim provedene analize određivanja koncentracije UF-a, UFL-a, UPA te određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (prema metodama opisanim u **poglavlju 3.3.2.**). Shematski prikaz postupka pročišćavanja uzoraka ekstrakcijom na čvrstoj fazi prikazan je na **Slici 3.4.**

Indeks biodostupnosti (*BI*) UF-a, UFL-a, UP-a i pojedinačnih fenolnih spojeva određen je prema sljedećem izrazu **(3.31)**:

$$BI (\%) = \frac{C_B}{C_A} \cdot 100 \quad (3.31)$$

gdje je C_A – udio fenolnih spojeva u uzorku prije *in vitro* simulirane probave, a C_B – udio fenolnih spojeva u ekstraktu nakon provedbe simulirane probave. Udio fenolnih spojeva izražen je na 100 mg ekstrakta.

3.3.9. Kinetika otpuštanja inkapsuliranih fenolnih spojeva

Razvoj inkapsulata i lijekova s kontroliranim otpuštanjem označio je značajan napredak u "isporuci" aktivnih tvari tijekom posljednja tri desetljeća i revolucionarni način primjene terapijskih sredstava. Srž ove inovacije je razumijevanje i primjena kinetike otpuštanja aktivne tvari, temeljnog aspekta koji određuje brzinu i opseg dostupnosti aktivne tvari tijelu. Upotreba matematičkih modela ne samo da pomaže u dizajnu novih sustava, već i u optimizaciji postojećih, osiguravajući da se postigne željeni profil oslobađanja aktivne tvari. Kroz integraciju matematičkog modeliranja i eksperimentalnih podataka, istraživači mogu podesiti otpuštanje inkapsuliranih fenolnih spojeva, među ostalim aktivnim tvarima, postižući preciznu kontrolu nad njihovim terapijskim učincima (Bruschi, 2015).

Uzimajući u obzir ove činjenice, četiri matematička modela: model prvog reda, Higuchi model, Hixson-Crowell model i Korsmeyer-Peppas model, korišteni su za opisivanje *in vitro* otpuštanja inkapsuliranih ukupnih fenolnih spojeva iz suhih inkapsulata u probavnom sustavu. Parametri modela prikazani u **Tablici 3.13.** su izračunati korištenjem softverskog alata DDSolver (Zhang i sur., 2010). Tri su kriterija korištena za procjenu uspješnosti opisivanja kinetike otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva: prilagođeni koeficijent determinacije (R^2_{adj}), Akaike informacijski kriterij (AIC) i kriterij odabira modela (MSC). Model koji daje više vrijednosti R^2_{adj} i MSC kriterija i niže vrijednosti AIC kriterija prikladniji je za opisivanje otpuštanja fenolnih spojeva tijekom simulirane probave *in vitro*.

Tablica 3.13 Matematički modeli korišteni za modeliranje *in vitro* otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa

Model	Jednadžba	Parametri
Model prvog reda	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	F – udio aktivne tvari (%) koja se oslobađa u vremenu t (min) k_1 – konstanta otpuštanja prvog reda
Higuchi model	$F = k_H \cdot t^{0,5}$	F – udio aktivne tvari (%) koja se oslobađa u vremenu t (min) k_H – Higuchijeva konstanta otpuštanja
Hixson-Crowell model	$F = 100 \cdot [(1 - (1 - k_{HC} \cdot t)^3)]$	F – udio aktivne tvari (%) koja se oslobađa u vremenu t (min) k_{HC} – Hixson-Crowellova konstanta otpuštanja
Korsmeyer-Peppas model	$F = k_{KP} \cdot t^n$	F – udio aktivne tvari (%) koja se oslobađa u vremenu t (min) k_{KP} – Korsmeyer-Peppasova konstanta otpuštanja n – eksponent otpuštanja/difuzije

3.3.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu eksperimentalno dobivenih podataka korišteni su specijalizirani programski alati: Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD) za vizualizaciju i obradu podataka te za naprednu statističku analizu Microsoft Excel dodatak XLSTAT i TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija, SAD).

Kako bi se testirala značajnost razlika u aritmetičkim sredinama koje predstavljaju specifične uzorke populacije, primijenjena je jednosmjerna i/ili faktorska analiza varijance (ANOVA). Kada je ANOVA pokazala postojanje statistički značajnih razlika između aritmetičkih sredina promatranih skupina podataka, provedena je dodatna analiza Duncanovim *post-hoc* testom za višestruke raspone kako bi se utvrdilo između kojih populacija postoji značajna razlika ($p < 0,05$). U vizualnim prikazima, kao što su slike ili tablice, podaci unutar iste populacije označeni su istim slovom abecede ili grčkog alfabeta, dok su oni koji pripadaju statistički različitim populacijama označeni različitim slovima, što jasno ukazuje na postojanje značajne statističke razlike među njima.

ZA OCJENU

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati eksperimentalnog istraživanja, popraćeni detaljnom raspravom. Kako bi se pružila sveobuhvatna analiza dobivenih rezultata, obuhvaćeno je više ključnih dijelova istraživanja kako slijedi:

- 1) **Analiza kemijskog sastava tropa grožđa.** U ovom dijelu rada analiziran je kemijski sastav korištenih uzoraka tropa grožđa (CS, CF i M) s ciljem određivanja udjela suhe tvari, vlakana, pepela, ugljika i dušika, proteina, masti, šećera, esencijalnih minerala, UF-a, UFL-a, UPA, pojedinačnih fenolnih spojeva te njihove antioksidacijske aktivnosti.
- 2) **Određivanje procesnih uvjeta konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari.** Optimalni uvjeti kruto-tekuće ekstrakcije (otapalo i omjer kruto-tekuće) fenolnih tvari određeni su na osnovi ostvarenog maksimalnog prinosa UF-a, UFL-a, UPA iz uzorka tropa grožđa CS.
- 3) **Inkapsulacija metodom ionskog geliranja.** U ovom dijelu rada definirani su:
 - a) optimalni uvjeti inkapsulacije CS ekstrakta metodom ionskog geliranja s obzirom na EE_{IG} ;
 - b) najprikladnija metoda sušenja hidrogelova i najprikladniji omotači za inkapsulaciju CS ekstrakta s obzirom na EE_{IG} , geometrijske parametre, teksturu, morfologiju te profil otpuštanja fenolnih spojeva u *in vitro* uvjetima simulirane probave bez prisustva enzima;
 - c) utjecaj ekstrakata (CS, CF i M) i omotača na EE_{IG} , geometrijske parametre, teksturu, morfologiju, kristaličnost/amorfnost inkapsulata te odabir najprikladnijeg matematičkog modela za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata u *in vitro* uvjetima simulirane probave bez prisustva enzima.
- 4) **Inkapsulacija metodom sušenja zamrzavanjem i sušenja raspršivanjem.** U ovom dijelu rada ispitana je $EE_{SR(SZ)}$ za ekstrakte CS, CF i M pomoću odabranih omotača prirodnog porijekla. Također, ispitana je kristaličnost inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem te je provedeno otpuštanje fenolnih spojeva u *in vitro* uvjetima simulirane probave bez prisustva i u prisustvu enzima.
- 5) **Biodostupnost fenolnih spojeva.** Određena je biodostupnost fenolnih spojeva (ukupnih i pojedinačnih) tijekom simulirane *in vitro* probave iz neinkapsuliranih i inkapsuliranih CS, CF i M ekstrakata pomoću tri metode inkapsulacije (ionsko geliranje, sušenje zamrzavanjem i sušenje raspršivanjem) te su uspoređeni rezultati dobiveni trima metodama inkapsulacije.

4.1. KEMIJSKI SASTAV TROPA GROŽĐA

Uzorci tropa grožđa (CS, CF i M) korišteni u ovom radu sastojali su se od sjemenki, pulpe i kože. Poznato je da trop grožđa obiluje raznovrsnim spojevima što ga nominira kao izvrsnu polaznu sirovinu za proizvodnju različitih visokovrijednih produkata (npr. enzima, ulja, dodataka prehrani, ekstrakata bogatih bioaktivnim tvarima, finih kemikalija, biogoriva, itd.). Kemijski sastav tropa grožđa ovisi o različitim faktorima, uključujući sortu grožđa, zemljopisno porijeklo, klimu i vrijeme berbe, tehnologiju prerade grožđa u različite proizvode i drugo. **Tablica 4.1** prikazuje kemijski sastav ispitivanih uzoraka tropa grožđa u ovom doktorskom radu.

Tablica 4.1 Kemijski sastav ispitivanih uzoraka tropa grožđa (CS, CF i M)

Komponenta	CS	CF	M
Suha tvar (%)	92,91 ± 0,01	91,59 ± 0,02	92,15 ± 0,04
NDF (% _{s.tv.})	50,33 ± 1,69	47,24 ± 0,56	57,55 ± 1,59
ADF (% _{s.tv.})	40,03 ± 2,35	37,60 ± 0,36	49,14 ± 3,06
ADL (lignin) (% _{s.tv.})	25,80 ± 0,92	23,77 ± 0,26	33,19 ± 2,06
Hemiceluloza (% _{s.tv.})	10,31 ± 0,96	9,64 ± 0,55	8,41 ± 1,47
Celuloza (% _{s.tv.})	14,22 ± 1,79	13,82 ± 0,62	15,95 ± 1,04
Glukoza (mg/g _{s.tv.})	4,53 ± 0,06	4,38 ± 0,13	5,21 ± 0,27
Arabinoza (mg/g _{s.tv.})	1,35 ± 0,46	1,50 ± 0,19	0,87 ± 0,50
Saharoza (mg/g _{s.tv.})	3,23 ± 0,11	9,87 ± 0,17	4,99 ± 0,31
Fruktoza (mg/g _{s.tv.})	8,51 ± 0,06	4,94 ± 0,04	6,66 ± 0,25
Reducirajući šećeri (mg _{GLU} /g _{s.tv.})	21,43 ± 1,55	21,91 ± 0,95	18,62 ± 0,71
TOC (mg/g _{s.tv.})	62,28 ± 0,69	59,22 ± 0,49	65,13 ± 0,27
TOC _E (mg/g _{s.tv.})	35,63 ± 1,14	53,32 ± 1,13	31,82 ± 0,57
TN (mg/g _{s.tv.})	1,27 ± 0,01	0,96 ± 0,03	1,52 ± 0,12
Udio pepela (% _{s.tv.})	4,89 ± 0,04	7,16 ± 0,15	3,78 ± 0,12
Fosfor (%)	0,26 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,33 ± 0,00
Kalcij (mg/100 g)	640,00 ± 0,00	596,60 ± 0,00	562,60 ± 0,00
Željezo (mg/100 g)	21,50 ± 0,00	21,80 ± 0,00	14,30 ± 0,00
Kalij (mg/ 100 g)	1335,20 ± 0,00	2156,70 ± 0,00	968,40 ± 0,00
Udio ukupnih proteina (% _{s.tv.})	7,38 ± 0,13	8,72 ± 0,26	7,47 ± 0,01
Udio topljivih proteina (mg/g _{s.tv.})	0,77 ± 0,08	3,16 ± 0,21	1,39 ± 0,27
Udio slobodnih masti (% _{s.tv.})	8,18 ± 0,59	8,54 ± 0,37	9,68 ± 0,67

NDF — neutralna detergent vlakna, ADF — kisela detergent vlakna, ADL — kiseli detergent lignin, TOC — ukupni organski ugljik u tropu grožđa, TOC_E — ukupni organski ugljik u tekućem ekstraktu tropa grožđa, TN — ukupni dušik, s.tv. — suha tvar, GLU — glukoza. Svi podaci izraženi su kao srednja vrijednost tri ponavljanja (n = 3) ± SD

Suha tvar sva tri ispitivana uzorka kretala se u rasponu od 91,59 – 92,91 %. Trop grožđa smatra se lignoceluloznim materijalom s obzirom na to da sadrži značajan udio netopivih vlakana odnosno lignina, celuloze i hemiceluloze. Lignin je kompleksna polimerna tvar prisutna u biljnoj staničnoj stijenci koja pruža čvrstoću i strukturalnu potporu biljkama čvrsto se vežući za druge komponente stanične stijenske, poput ugljikohidrata celuloze i hemiceluloze (Guerriero i sur., 2016; Zoghلامي i Paës, 2019). Nakon odvajanja od ugljikohidrata, lignin se često odbacuje kao otpad, no veliki je interes znanstvene zajednice za njegovu pretvorbu u visokovrijedne proizvode zbog visokog udjela ugljika, antioksidativnih svojstava, visoke

toplinske stabilnosti i povoljne čvrstoće (Kai i sur., 2016; Zadeh i sur., 2018). Međutim, pronalaženje učinkovite metode odvajanja lignina od ugljikohidrata predstavlja izazov zbog njegove teške topljivosti i kompleksne strukture. Određene vrijednosti udjela lignina u ispitivanim uzorcima tropa grožđa kretale su se u rasponu od 23,77 do 33,19 %_{s.tv.} što je u skladu s literaturnim podacima za iste sorte tropa grožđa, ali s drugog geografskog područja (Virginia, Washington i Oregon, SAD) gdje se taj udio kretao u rasponu od 28,4 do 40,7 %_{s.tv.} (Deng i sur., 2011; Jin i sur., 2019).

Celuloza je linearni polimer i sastoji se od dugih lanaca jedinica celobioze koje su povezane s D-glukoznim podjedinicama β -(1,4)-glikozidnim vezama (Geng i sur., 2019). Hemiceluloza je heteropolimer koji se sastoji od grana kratkih lateralnih monosaharida poput pentoza (ksiloza, ramnoza i arabinoza), heksoza (glukoza, manosa i galaktoza) i uronske kiseline (Gibson, 2012). Udio celuloze u uzorima kretao se u rasponu od 13,82 do 15,95 %_{s.tv.}, a hemiceluloze od 8,41 do 10,31 %_{s.tv.} što je u skladu s literaturnim vrijednostima za udio ovih spojeva u tropu grožđa (Bucić-Kojić i sur., 2022). Celuloza i hemiceluloza se mogu kemijski vezati s fenolnim spojevima i tvoriti takozvana „antioksidativna vlakna“, a ranija istraživanja drugih autora su potvrdila njihov pozitivan antioksidativni učinak na ljudsko zdravlje (Saura-Calixto, 1998; Mildner-Szkudlarz i sur., 2013). Upravo zbog ovih svojstava, koncept obogaćivanja prehrambenih proizvoda vlaknima iz tropa grožđa već je široko prihvaćen od strane tržišta i potrošača. Brojna su eksperimentalna istraživanja proširila asortiman ovakvih proizvoda, uključujući tjesteninu fettuccini (Sant’Anna i sur., 2014), jogurt i preljev za salatu (Tseng i Zhao, 2013), kolačiće (Acun i Gül, 2014) te hrenovke (Özvural i Vural, 2011).

Nadalje, trop grožđa kao lignocelulozna biomasa ima potencijal primjene u proizvodnji biogoriva, biokemikalija i biomaterijala uz prethodnu obradu (Balan i sur., 2013). Za proizvodnju biogoriva potrebna je biokemijska, termokemijska ili hibridna obrada biomase, ali dobre alternative su obnovljivi i ekološki prihvatljivi biološki procesi koji koriste mikroorganizme kao što su gljive ili bakterije za razgradnju lignocelulozne (Baral i sur., 2019). Nadalje, iz lignoceluloznog materijala moguće je proizvesti širok raspon biokemikalija zbog velike raznolikosti monomernih jedinica i veza koje čine lignoceluloznu strukturu. Lignin se koristi za dobivanje aromatskih spojeva (Borrero-López i sur., 2018; Schutyser i sur., 2018), dok se šećeri iz hidrolizirane celuloze i hemiceluloze mogu pretvoriti u različite vrijedne proizvode s pet i šest atoma ugljika poput glicerola, sorbitola, ksilitola, octene, jabučne, levulinske, asparaginske i oksalne kiseline i drugih proizvoda (Werpy i Petersen, 2004). Nadalje, lignocelulozni materijali se mogu koristiti u proizvodnji biomaterijala i tekstilnih

vlakana (Chen i Zhong, 2015) te adsorbenata (Satyanarayana i sur., 2009). Celuloza se može koristiti za proizvodnju raznih derivata poput celuloznih etera i estera (Seddiqi i sur., 2021), dok se hemiceluloza može koristiti za proizvodnju antioksidativnih filmova ili hidrogelova s potencijalnom primjenom u biomedicini i pakiranju hrane (Zhao i sur., 2020).

Od dvanaest ispitanih standarda šećera, četiri su identificirana i kvantificirana (glukoza, arabinoza, fruktoza i saharoza) te je njihov udio u tropu grožđa iznosio 1,35 – 8,51 mg/g_{s.tv.} za CS, 1,50 – 9,87 mg/g_{s.tv.} za CF te 0,87 – 6,66 mg/g_{s.tv.} za M, dok je udio reducirajućih šećera za sve uzorke iznosio u rasponu 18,62 – 21,91 mg_{GLU}/g_{s.tv.} (**Tablica 4.1**). Može se pretpostaviti da je nizak maseni udio pojedinačnih šećera u ispitivanim uzorcima tropa grožđa rezultat procesa proizvodnje crnih vina gdje šećeri služe kao izvor hrane za kvasce tijekom procesa fermentacije (Guillaume i sur., 2007). Veći udio topivih šećera, posebno glukoze i fruktoze, obično se nalazi u tropu bijelih sorti grožđa. Detektirani šećeri se dalje mogu koristiti, uz prethodno pročišćavanje primjerice membranskom filtracijom, za proizvodnju različitih kemikalija ili se mogu primjenjivati kao poboljšivači slatkog okusa u različitim proizvodima (Jin i sur., 2019). Nadalje, zbog prisutnih šećera, trop grožđa se često razmatra kao polazna sirovina u proizvodnji etanola i biogoriva (Dávila i sur., 2017). Osim toga određeni su i udio ukupnog ugljika u tropu grožđa koji se kretao se u rasponu 59,22 – 65,13 mg/g_{s.tv.}, te u tekućem ekstraktu tropa u rasponu 31,82 – 53,32 mg/g_{s.tv.} kao i udio ukupnog dušika tropu u rasponu 0,96 – 1,52 mg/g_{s.tv.}, koji igraju važnu ulogu u proizvodnji biogoriva i biognojiva.

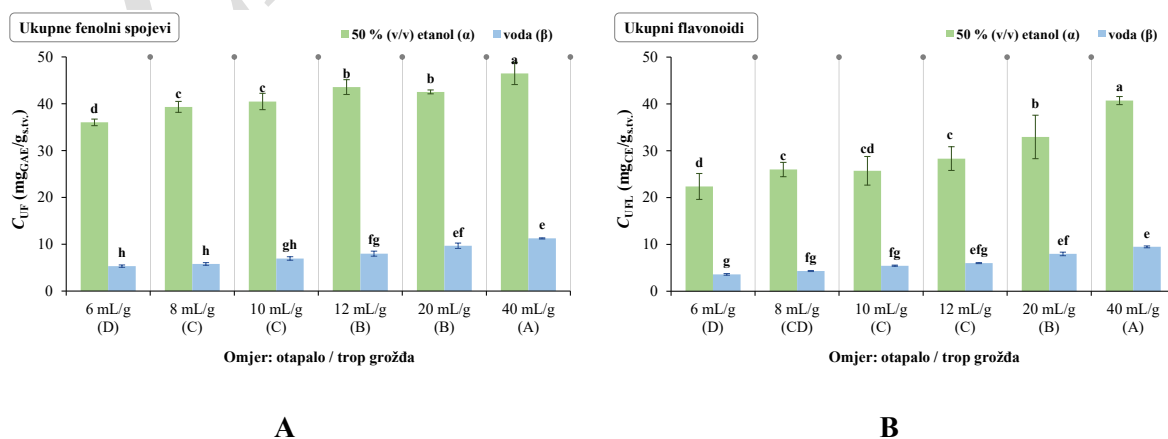
Trop grožđa predstavlja značajan izvor mineralnih tvari, stoga je određen udio pepela kao pokazatelj udjela mineralnih tvari. Udio pepela u tropu grožđa kretao se u rasponu od 3,78 do 7,16 %_{s.tv.}, a najveći udio dokazan je kod uzorka CF (**Tablica 4.1**). Prema literaturi, različite sorte grožđa sadrže različite udjele pepela. Primjerice, za cabernet sauvignon udio pepela kretao se u rasponu 6,02 – 7,6 %_{s.tv.} (Deng i sur., 2011; Lou i sur., 2021), dok je prema Jin i sur. (2019) udio pepela u cabernet franc tropu grožđa iznosio je 5,24 %_{s.tv.}, a u sorti merlot 6,08 – 7,2 %_{s.tv.} (Deng i sur., 2011; Jin i sur., 2019). Što se tiče esencijalnih minerala, željezo može biti prisutno u tropu grožđa u širokom rasponu (5 – 5468 mg/100 g) ovisno o mnogim faktorima kao što su sorta, klimatski i geografski uvjeti (Antonić i sur., 2020). U ovom radu, ispitivani uzorci imali su relativno ujednačen udio željeza koji se kretao u rasponu od 14,30 mg/100 g do 21,80 mg/100 g. Željezo ima veliku ulogu u sastavu tropa grožđa jer ima utjecaj na njegov antioksidacijski potencijal (Sousa i sur., 2014). Nadalje, kalcij (562,60 – 640,00 mg/100 g) i kalij (968,40 – 2156,70 mg/100 g) su detektirani u znatno većim koncentracijama od željeza. Kalij je od velike

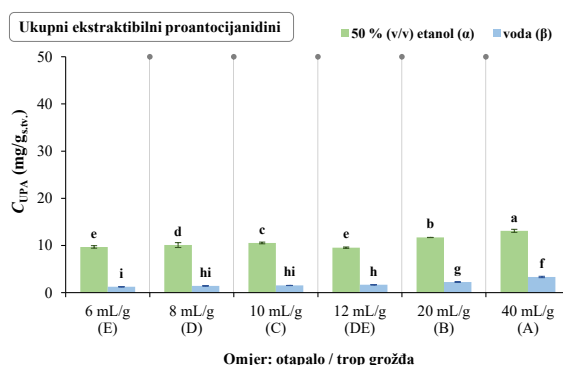
važnosti zbog svoje uloge u regulaciji krvnog tlaka i smanjivanju rizika od osteoporoze (Sousa i sur., 2014), a trop grožđa se ističe kao značajan izvor ovog esencijalnog minerala.

Nadalje, udio ukupnih proteina kretao se u rasponu od 7,38 %_{s.tv.} do 8,72 %_{s.tv.}, a topljivih proteina u rasponu od 0,77 %_{s.tv.} do 3,16 mg/g_{s.tv.}, te udio slobodnih masti od 8,18 %_{s.tv.} do 9,68 %_{s.tv.}. Proteini su ključan izvor aminokiselina u prehrani kako ljudi, tako i životinja. Međutim, iako je trop grožđa bogat proteinima, istraživanja su pokazala da većina životinja ne može probaviti te proteine i iskoristiti ih kao izvor energije (Nistor i sur., 2014). Masti se također smatraju ključnim izvorom energije, ali također doprinose funkcionalnim i senzorskim karakteristikama hrane te su nositelji mnogih drugih spojeva poput aroma, vitamina i boja (Delaš, 2011). Ova svojstva doprinose potencijalnoj primjeni tropa grožđa kao dodatka u proizvodnji formulacija stočne hrane.

4.2. ODREĐIVANJE PROCESNIH UVJETA EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA IZ TROPA GROŽĐA

Ekstrakcija je jedan od najvažnijih koraka u izolaciji i identifikaciji fenolnih spojeva, a budući da ne postoji standardna metoda ekstrakcije za sve fenolne spojeve biljnog materijala nužno je odrediti optimalne procesne uvjete promatranog ekstrakcijskog sustava. Kruto-tekuća ekstrakcija je konvencionalna i najčešće korištena metoda ekstrakcije fenolnih spojeva, ali njezina uspješnost ovisi o brojnim procesnim parametrima uključujući između ostalog i odabir vrste i koncentracije ekstrakcijskog otapala te omjera otapala i uzorka. S obzirom na ovu spoznaju, provedeno je istraživanje utjecaja dva otapala, destilirane vode i 50 %-tne vodene otopine etanola i šest različitih omjera tekuće/kruto (6 mL/g, 8 mL/g, 10 mL/g, 12 mL/g, 20 mL/g i 40 mL/g) na prinos fenolnih spojeva (UF, UFL i UPA) tijekom kruto-tekuće ekstrakcije iz uzorka CS, a rezultati su prikazani na Slici 4.1.





C

Slika 4.1 Utjecaj otapala (50 %-tni etanol i voda) i omjera tekuće/kruto (6 – 40 mL/g) na ekstraktibilnost (A) ukupnih fenolnih spojeva (C_{UF}), (B) ukupnih flavonoida (C_{UFL}) i (C) ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (C_{UPA}) iz uzorka CS. Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$

Statistička analiza (ANOVA) pokazala je da je na sve skupine ispitivanih fenolnih spojeva najveći utjecaj na varijabilnost podataka imalo otapalo (85,5 – 97,1 % varijance), dok je manji utjecaj imao omjer tekuće/kruto (2,4 – 10,1 %) kao i interakcija ova dva faktora (0,2 – 2,6 %) (Tablica 4.2). Skupno za sve ispitivane fenolne spojeve ostvareni su veći prinosi (3,9 – 7,8 puta) kada je 50 %-tni etanol korišten kao otapalo u odnosu na destiliranu vodu bez obzira na ispitivani omjer tekuće/kruto (Slika 4.1 A – C). Najveći prinos UF-a (46,49 mg_{GAE}/g_{s.tv.}) (Slika 4.1 A), UFL (40,71 mg_{CE}/g_{s.tv.}) (Slika 4.1 B) i UPA (13,09 mg/g_{s.tv.}) (Slika 4.1 C) ostvaren je kada je korišten omjer tekuće/kruto 40 mL/g i 50 %-tna vodena otopina etanola kao otapalo.

Tablica 4.2 Faktorski ANOVA test za UF, UFL i UPA - značajnost utjecaja otapala (50 % (v/v) etanol, voda) i omjera: otapalo/tropa grožđa (CS, CF i M) kod optimiranja konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije tropa grožđa te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

	Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
UF	Otapalo	10144,2	1	10144,2	8639,38	0,0000 *	97,1 %
	Omjer	252,7	5	50,5	43,04	0,0000 *	2,4 %
	Otapalo × omjer	23,3	5	4,7	3,98	0,0091 *	0,2 %
	Pogreška	28,2	24	1,2			
UFL	Otapalo	4848,5	1	4848,5	1203,02	0,0000 *	85,5 %
	Omjer	574,5	5	114,9	28,51	0,0000 *	10,1 %
	Otapalo × omjer	148,6	5	29,7	7,37	0,0003 *	2,6 %
	Pogreška	96,73	24	4,0			
UPA	Otapalo	707,1	1	707,1	16152,90	0,0000 *	94,8 %
	Omjer	33,9	5	6,8	154,98	0,0000 *	4,5 %
	Otapalo × omjer	3,6	5	0,7	16,33	0,0000 *	0,5 %
	Pogreška	1,051	24	0,0			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

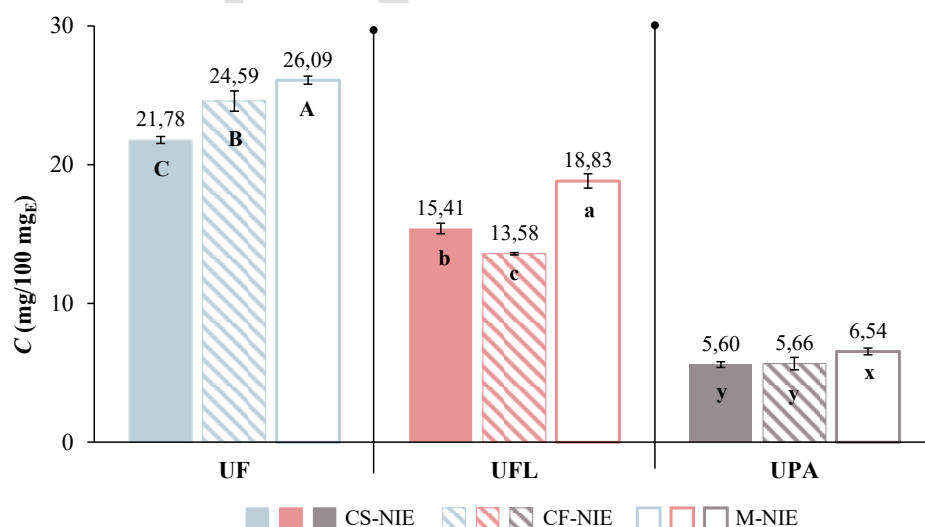
Kruto-tekuću ekstrakciju karakterizira prijenos mase u kojem analit iz krutog uzorka prelazi u otapalo s kojim je u dodiru te stoga otapalo ima vrlo važnu ulogu u procesu ekstrakcije. Fenolni spojevi su polarni spojevi te se dobro ekstrahiraju u polarnim otapalima kao što su metanol, etanol, voda ili aceton i njihove smjese što su ujedno i najčešće korištena otapala za njihovu ekstrakciju (Farooq i sur., 2020). Prema dobivenim rezultatima u ovom radu kao i rezultatima drugih autora (Brazinha i sur., 2014; Sun i sur., 2015; Rodrigues i sur., 2023) vodene otopine alkohola ili acetona u odnosu na čista otapala rezultiraju boljim prinosima fenolnih spojeva. Primjerice, Rodrigues i sur. (2023) ispitali su utjecaj etanola, metanola, acetona, butanola te njihovih 50 %-tnih vodenih otopina i čiste vode na kruto-tekuću ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva iz tropa grožđa pri omjeru tekuće/kruto 10 mL/g. Rezultati su pokazali da je dodavanje 50 % vode svakom čistom otapalu povećalo prinos fenolnih spojeva u usporedbi s upotrebom čistog otapala i to 2,3 puta kada je korišten metanol, a čak 12,5 puta kada je korišten aceton. S druge strane usporedbom učinkovitosti ekstrakcije fenolnih spojeva s čistom vodom i 50%-tnim vodenim otopinama korištenih otapala uočeno je da je pomoću vode ostvaren manji prinos fenolnih spojeva i to između 5,3 puta u slučaju metanola i 9,8 puta u slučaju acetona. Naime, čisti alkohol uzrokuje dehidraciju i razaranje biljnih stanica te uzrokuje raspad veze između analita i stanične stijenke dok voda djeluje kao sredstvo za „bubrenje“ biljnog materijala, povećavajući kontaktnu površinu između otapala i materija što rezultira boljim prijenosom analita u otapalo (Garcia-Castello i sur., 2015; Medina-Torres i sur., 2017).

Osim otapala, iz dobivenih rezultata vidljivo je i da omjer tekuće/kruto ima određeni utjecaj na ekstraktibilnost fenolnih spojeva budući da utječe na brzinu prijenosa mase prilikom ekstrakcije. Količina dodanog otapala trebala bi biti dovoljna za otapanje željenih spojeva, međutim, kako se i drugi prisutni spojevi ekstrahiraju, često je potrebna veća količina otapala (Silva i sur., 2015). Drugim riječima, veći volumen otapala u odnosu na masu uzorka u pravilu ubrzava proces difuzije zbog većeg koncentracijskog gradijenta što rezultira boljim prijenosom mase (Rodríguez De Luna i sur., 2020). Ipak u slučaju ukupnih UPA kada je korišten 50 % -tni etanol kao otapalo uočen je različit utjecaj omjera tekuće/kruto na njihov prinos u odnosu na prinos ostvaren za UF i UFL kod kojih je prinos rastao s porastom omjera tekuće/kruto ($6 < 8 < 10 < 12 < 20 < 40$ mL/g) (**Slika 4.1 A i B**). Naime, iako je korištenjem 50 %-tnog etanola također ostvaren najveći prinos UPA kao i kod UF-a, i UFL-a pri omjeru 40 mL/g, kod drugih korištenih omjera tekuće/ kruto uočene su manje fluktuacije pa je uz omjer 10 mL/g i 8 mL/g ostvaren je nešto veći prinos ukupnih proantocijanidina nego li pri omjeru tekuće kruto od 12 mL/g (**Slika 4.1 C**).

Sveukupno, na temelju postignutih maksimalnih prinosa UF, UFL i UPA, može se zaključiti da su optimalni uvjeti konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije ovih spojeva iz tropa grožđa postignuti korištenjem omjera tekuće/kruto 40 mL/g i 50 %-tne vodene otopine etanola, stoga su za pripreme ekstrakata dalje tijekom eksperimentalnog rada korišteni ovi uvjeti ekstrakcije.

4.3. MASENI UDIO UKUPNIH I POJEDINAČNIH FENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA TROPA GROŽĐA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA

Određeni optimalni uvjeti ekstrakcije fenolnih spojeva na CS uzorku dalje su korišteni za pripremu svih ostalih tekućih ekstrakata (CF i M) koji su potom koncentrirani do suhog (dalje u tekstu neinkapsulirani ekstrakti, NIE), prema protokolu opisanom u **poglavlju 3.3.2.1.** te su u njima određene koncentracije fenolnih spojeva u konačnici izražene kao maseni udjeli UF-a, UFL-a, UPA (**Slika 4.2**) i pojedinačnih fenolnih spojeva (**Tablica 4.3**). Maseni udio UF-a u svim NIE uzorcima varirao je između 21,78 – 26,09 mg_{GAE}/100 mg_E, UFL-a između 13,58 – 18,83 mg_{CE}/100 mg_E te UPA 5,60 – 6,54 mg/100 mg_E. Rezultati pokazuju da je ekstrakt imao statistički značajan (ANOVA, $p < 0,05$) utjecaj na maseni udio svih ispitivanih fenolnih spojeva s izuzetkom kod UPA gdje je vidljivo da nema statistički značajne razlike u udjelu UPA u CS-NIE i CF-NIE dok se M-NIE od njih statistički razlikovao po masenom udjelu UPA. Najveći maseni udjeli svih fenolnih spojeva zabilježeni su kod M-NIE uzorka (**Slika 4.2**).



Slika 4.2 Maseni udio (C) UF-a, UFL-a i UPA u neinkapsuliranim ekstraktima (NIE) tropa grožđa CS, CF i M izraženima u mg po 100 mg ekstrakta (E u indeksu mjerne jedinice). Različita slova abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju po skupinama fenolnih spojeva prema jednosmjernom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$

Uspoređujući dobivene rezultate s dostupnim literaturnim podacima, primjećuje se značajna varijabilnost rezultata, što je posljedica mnogih čimbenika, uključujući sortu, klimatske uvjete, agrotehničke uvjete, geografski položaj, proces proizvodnje vina, metode ekstrakcije i mnoge druge čimbenike (Deng i sur. 2011). Na primjer, Rockenbach i sur. (2011) analizirali su udio UF-a u ekstraktima tropa grožđa sorti CS i M iz vinarije Videira (Brazil, berba 2008. godine) i zabilježili su različite rezultate, odnosno 7,48 mg_{GAE}/100 mg_E za CS uzorak i 4,62 mg_{GAE}/100 mg_E za M uzorak. Slično tome, istraživanje Iora i sur. (2015) obuhvatilo je analizu ekstrakata tropa grožđa sorti CS i M uzgojenih u regiji Toledo (Brazil, berba 2012. godine), pri čemu su zabilježili veći sadržaj UF-a i UFL-a u uzorku CS (UF = 5,10 mg_{GAE}/100 mg_E; UFL = 2,98 mg_{CE}/100 mg_E) nego u M uzorku (UF = 3,76 mg_{GAE}/100 mg_E; UFL = 2,12 mg_{CE}/100 mg_E). Nadalje, Xu i sur. (2016) proučavali su sastav ekstrakta tropa sorte CF iz okruga Orange (Orange, VA, SAD) i odredili udio UF-a od 15,38 mg_{GAE}/100 mg_E i UFL-a od 9,17 mg_{CE}/100 mg_E, dok su Jin i sur. (2019) dobili 36,1 mg_{GAE}/g_{s.tv.} za UF, 16,3 mg_{CE}/g_{s.tv.} za UFL i 21,2 mg/g_{s.tv.} za UPA za CF iz područja Crozeta (Crozet, VA, SAD).

Udio i profil pojedinačnih fenolnih spojeva u NIE uzorcima određeni su pomoću UHPLC-a, a rezultati su prikazani u **Tablici 4.3**.

Tablica 4.3 Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva u neinkapsuliranim ekstraktima (NIE) tropova grožđa CS, CF i M

	CS-NIE	CF-NIE	M-NIE
Fenolne kiseline (µg/100 mg_E)			
Galna kiselina	161,99 ± 31,68	130,00 ± 10,98	207,79 ± 10,15
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	62,02 ± 11,60	24,09 ± 1,97	75,63 ± 5,51
Vanilinska kiselina	10,45 ± 0,80	14,83 ± 0,74	12,34 ± 0,25
Siringinska kiselina	88,88 ± 20,39	114,36 ± 3,02	51,89 ± 9,07
Elaginska kiselina	94,72 ± 10,39	81,33 ± 1,23	16,32 ± 0,12
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	2,97 ± 0,54	1,00 ± 0,04	2,10 ± 0,09
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	7,46 ± 1,39	19,48 ± 0,58	9,60 ± 0,60
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	3,43 ± 0,71	1,44 ± 0,04	3,31 ± 0,20
Kafeinska kiselina	1,40 ± 0,04	1,04 ± 0,02	0,75 ± 0,01
Ferulinska kiselina	0,97 ± 0,01	2,52 ± 0,25	0,97 ± 0,08
Flavanoli (µg/100 mg_E)			
Epikatehin	100,71 ± 11,65	547,27 ± 25,23	248,31 ± 9,17
Katehin	240,87 ± 13,61	527,59 ± 28,62	272,26 ± 0,42
Epikatehin galat	5,78 ± 2,74	32,46 ± 1,65	8,29 ± 0,04
Galokatehin galat	72,53 ± 21,84	127,23 ± 9,54	76,11 ± 4,85
Procijanidin B1	118,52 ± 25,63	317,42 ± 2,59	197,93 ± 16,51

Procijanidin B2	46,57 ± 21,88	126,51 ± 23,32	62,19 ± 2,76
Flavonoli (µg/100 mg_E)			
Kvercetin	214,33 ± 24,44	146,04 ± 3,93	5,19 ± 0,06
Rutin	13,14 ± 3,60	65,08 ± 5,10	24,13 ± 0,95
Kempferol	13,22 ± 1,34	10,40 ± 1,00	5,19 ± 0,06
Stilbeni (µg/100 mg_E)			
Resveratrol	7,91 ± 0,45	8,82 ± 0,40	14,16 ± 0,37
ε-Viniferin	22,75 ± 0,58	13,72 ± 0,06	8,53 ± 0,31
Antocijani (µg/100 mg_E)			
Oenin klorid	91,28 ± 0,72	794,37 ± 21,84	32,83 ± 0,36
Mirtilin klorid	12,09 ± 0,04	35,15 ± 0,00	2,81 ± 0,01
Petunidin klorid	1,89 ± 0,08	7,77 ± 0,01	0,67 ± 0,03
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid	9,76 ± 0,02	77,75 ± 7,28	7,17 ± 0,09
Kuromanin klorid	2,29 ± 0,00	4,88 ± 0,03	1,11 ± 0,15
Kalistefin klorid	nd	2,27 ± 0,03	nd

nd – spoj nije identificiran. Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva (µg/100 mg_E) prikazan je kao srednja vrijednost tri ponavljanja ± SD

Od 33 ispitana fenolna spoja iz vlastite baze standarada, u CS-NIE i M-NIE identificirano je i kvantificirano 26 fenolnih spojeva, odnosno 27 fenolnih spojeva u CF-NIE uzorku koji pripadaju skupinama fenolnih kiselina, flavanola, flavonola, stilbena i antocijana.

U svim ekstraktima od hidroksibenzojevih kiselina u najvećim koncentracijama je detektirana galna kiselina (130,00 – 207,79 µg/100 mg_E) a potom siringinska kiselina (51,89 – 114,36 µg/100 mg_E), elaginska kiselina (16,32 – 94,72 µg/100 mg_E), 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (24,09 – 75,63 µg/100 mg_E), vanilinska kiselina (10,45 – 14,83 µg/100 mg_E) i *p*-hidroksibenzojeva kiselina (1,00 – 2,97 µg/100 mg_E). Galna kiselina prisutna je u mnogo voća i povrća i ima širok spektar bioloških funkcija, uključujući antikancerogeno, antimikrobno i antioksidativno djelovanje. Siringinska kiselina, poznata po svojim blagotvornim učincima na oksidativni stres (Cotoras i sur., 2014), zaštititi jetre (Ramachandran i Raja, 2010) te protuupalnom (Lee i sur., 2013), antidijabetskom (Wei i sur., 2012) i neuroprotektivnom djelovanju (Güven i sur., 2015) kao i elaginska kiselina. S druge strane, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina pokazuje obećavajuća protuupalna, neuroprotektivna, antidijabetska i antioksidativna svojstva, otvarajući mogućnosti za njezinu terapijsku primjenu (Song i sur., 2020). Međutim, njihova slaba topljivost, stabilnost, bioraspoloživost te brzi metabolizam i izlučivanje ograničavaju njihov terapijski potencijal (Liu i sur., 2019; Yang i sur., 2020) te je namjera mnogih istraživanja razvoj formulacija koje bi omogućile kontrolirano

i ciljano oslobađanje fenolnih kiselina, ali i aktivnih tvari općenito, na mjestu apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Prisutne u nižim koncentracijama, vanilinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina u literaturi su opisane kao fenolne kiseline s raznolikim biološkim aktivnostima. Obje pokazuju antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje. Vanilinska kiselina dodatno se povezuje s potencijalnim neuroprotektivnim i kardioprotektivnim učincima te se često navodi kao važan metabolit drugih fenolnih spojeva (Kafali i sur., 2024). S druge strane, *p*-hidroksibenzojeva kiselina pokazuje širi spektar djelovanja, uključujući antialgalno, antimutageno, antiestrogeno, hipoglikemičko i antitrombocitno djelovanje, kao i antivirusna svojstva (Manuja i sur., 2013). Iako se ne nalaze u visokim koncentracijama u tropu grožđa, kafeinska, ferulinska i kumarinske kiseline imaju izuzetnu važnost zbog svojih mnogobrojnih korisnih bioloških djelovanja – posjeduju antioksidativna i antitumorska svojstva, doprinose prevenciji kardiovaskularnih bolesti i visokog krvnog tlaka (Kiliç i Yeşiloğlu, 2013; Kowczyk-Sadowy i sur., 2015; Oniszcuk, 2016), a prehrana obogaćena ovim hidroksicimetnim kiselinama smanjuje rizik od Alzheimerove bolesti i ateroskleroze (Morris, 2002; Anderson, 2004). Od ispitanih hidroksicimetnih kiselina, u najvišim koncentracijama u svim ekstraktima kvantificirana je *o*-kumarinska kiselina (7,46 – 19,48 µg/100 mg_E), a potom ju slijede *p*-kumarinska kiselina (1,44 – 3,43 µg/100 mg_E), ferulinska kiselina (0,97 – 2,52 µg/100 mg_E) i kafeinska kiselina (0,75 – 1,40 µg/100 mg_E).

Flavanoli prisutni u tropu grožđa, uglavnom su u obliku katehina i čine značajan udio (13 – 30 %) ukupnog udjela fenola u tropu crnog grožđa, dok je njihov sadržaj veći u tropu bijelog grožđa (46 – 56 %) (Georgiev i sur., 2014). Iz **Tablice 4.3** vidljivo je da su epikatehin (100,71 – 547,27 µg/100 mg_E) i katehin (240,87 – 527,59 µg/100 mg_E) zajedno s procijanidinom B1 (118,52 – 317,42 µg/100 mg_E) bili jedni od najzastupljenijih fenolnih spojeva u ekstraktima, dok su galokatehin galat (72,53 – 127,23 µg/100 mg_E) i epikatehin galat (5,78 – 32,46 µg/100 mg_E) bili zastupljeni u nešto nižim koncentracijama u odnosu na navedene spojeve. Flavanoli su spojevi od iznimno velikog interesa s obzirom da je dokazan njihov pozitivan utjecaj na zdravlje kardiovaskularnog sustava (Heptinstall i sur., 2006). Proantocijanidini pokazuju snažno antikancerogeno, antimikrobno i kemoprotektivno djelovanje, kao i snažan antioksidativni učinak (Yunhai i sur., 2003; Beecher, 2004; Nandakumar i sur., 2008; Xu i sur., 2012).

Flavonol kvercetin bio je najzastupljeniji flavonol u svim NIE (5,19 – 214,33 µg/100 mg_E) dok su rutin i kempferol bili prisutni u ekstraktima u nižim koncentracijama (5,19 – 65,08 µg/100

mg_E). Prema literaturi dokazano je pozitivno djelovanje flavonola protiv osteoporoze u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima (Shen i sur., 2022).

Kao i svi drugi fenolni spojevi, stilbeni posjeduju antioksidativno djelovanje, ali također doprinose prevenciji raka i kardiovaskularnih bolesti te imaju neuroprotektivna i protuupalna svojstva (Guerrero i sur., 2016). U NIE su kvantificirani resveratrol i njegov dimer, ϵ -viniferin, pri čemu je ϵ -viniferin detektiran u nešto višim koncentracijama kod CS-NIE (22,75 mg/100 g_{s.tv.}) i CF-NIE (13,72 μ g/100 mg_E), a kod M-NIE uočene su više koncentracije resveratrola (14,16 μ g/100 mg_E) (**Tablica 4.3**).

Posljednja ispitivana skupina fenolnih spojeva bili su antocijani, koji se obično povezuju s bojom grožđa i mogu se koristiti kao prirodni pigmenti. Međutim, oni također doprinose zdravlju svojim kardioprotektivnim, antitrombotičkim, antiaterosklerotskim, vazoprotektivnim i protuupalnim (Castellanos-Gallo i sur., 2022). Iz **Tablice 4.3** mogu se vidjeti velike razlike u koncentraciji antocijana, ali i velike razlike između koncentracije istih antocijana između ekstrakata. Može se uočiti da je kalistefin klorid identificiran isključivo u uzorku CF-NIE. Ipak, zajedničko je svim ekstraktima da su kvantificirane najveće koncentracije antocijana oenin klorida (32,83 – 794,37 μ g/100 mg_E) i peonidin-3-*O*-glukozid klorida (7,17 – 77,75 μ g/100 mg_E). Antocijanima se pripisuju slična svojstva kao i mnogim flavanolima i flavonima poput antioksidativnih, antivirusnih i antikancerogenih svojstava (Flamini i sur., 2013; Chagas i sur., 2022; Luo i sur., 2022). Također, Fabroni i sur. (2016) pronašli su povezanost između ekstrakta bogatog antocijanima i učinka protiv pretilosti kroz inhibiciju aktivnosti lipaze gušterače.

Analizirana je i antioksidacijska aktivnost ekstrakata ispitivanih uzoraka tropa grožđa s pomoću tri metode odnosno s pomoću DPPH, ABTS i FRAP metode kako bi se dobio potpuniji uvid u antioksidacijsku aktivnost ekstrakata tropa grožđa. Osim toga ispitana je korelacija antioksidacijske aktivnosti i UF-a, UFL-a i UPA. Rezultati antioksidacijske aktivnosti su prikazani u ekvivalentima troloksa (TE) poznatog kao snažnog antioksidansa (**Tablica 4.4**).

Tablica 4.4 Antioksidacijska aktivnost NIE (CS, CF, M) određena prema DPPH, ABTS i FRAP metodama i korelacija antioksidacijske aktivnosti i koncentracije fenolnih spojeva (UF, UFL i UPA)

	CS-NIE	CF-NIE	M-NIE
Fenolni spojevi			
UF (mg _{GAE} /mL)	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,13 ± 0,00
UFL (mg _{CE} /mL)	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01
UPA (mg/mL)	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Antioksidacijska aktivnost			
DPPH (mg _{TE} /mL)	0,16 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,20 ± 0,01

ABTS (mg _{TE} /mL)	0,07 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,10 ± 0,00
FRAP (mg _{TE} /mL)	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Korelacija fenolni spojevi : antioksidacijska aktivnost			
UF : DPPH		0,912	
UF : ABTS		0,954	
UF : FRAP		0,999	
UFL : DPPH		0,938	
UFL : ABTS		0,973	
UFL : FRAP		0,965	
UPA : DPPH		0,839	
UPA : ABTS		0,898	
UPA : FRAP		0,883	

Rezultati antioksidacijske aktivnosti su prikazani kao srednje vrijednosti tri ponavljanja ($n = 3$) ± SD. GAE – ekvivalenti galne kiseline, CE – ekvivalenti katehina, TE – ekvivalenti troloksa

Najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za sve ispitivane uzorke dobivene su primjenom DPPH metode (0,16 – 0,24 mg_{TE}/mL), potom ABTS metode (0,07 – 0,14 mg_{TE}/mL), te FRAP metode (0,06 – 0,12 mg_{TE}/mL). Prisutne razlike u rezultatima antioksidacijske aktivnosti ekstrakata su posljedica različitih principa i osjetljivosti metoda na prisutnost određenih antioksidanasa u uzorcima što su uočili i Rockenbach i sur. (2011). Iako ekstrakt tropa grožđa obiluje različitim spojevima koje mogu imati antioksidativno djelovanje, ipak se ono najčešće povezuje s prisutnošću fenolnih spojeva što je dokazano i u ovom radu. Naime, korelacija između vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ekstrakata bez obzira na korištenu metodu određivanja i udjela ukupnih fenolnih spojeva (UF, UFL i UPA) kretala se u rasponu od 0,839 do 0,999 što upućuje na doprinos ovih fenolnih spojeva ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata tropa grožđa (**Tablica 4.4**).

4.4. INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA METODOM IONSKOG GELIRANJA

4.4.1. Optimiranje uvjeta inkapsulacije ionskim geliranjem

Rezultati za učinkovitost inkapsulacije ionskim geliranjem (EE_{IG}) ukupnih fenolnih tvari iz CS ekstrakata za ukupno petnaest eksperimenata definiranih prema Box-Bhenkenovom planu pokusa kretali su se u rasponu od 21,47 do 53,67 % (**Tablica 4.5**). Kako bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli inkapsulacije i njihove interakcije (masenog udjela NA, koncentracije CaCl₂ i vremena umrežavanja) na zavisnu varijablu (EE_{IG}) te provjerila prikladnost primijenjenog Box-Behnkenovog plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa

inkapsulacije, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka (Tablica 4.5) matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema izrazu (3.25) pomoću programskog paketa Design Expert 12.

Tablica 4.5 Srednje vrijednosti za EE_{IG} ukupnih fenolnih tvari iz CS ekstrakata pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta inkapsulacije (maseni udio NA – X_1 , koncentracija $CaCl_2$ – X_2 te vrijeme umrežavanja – X_3) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1	Faktor X_2	Faktor X_3	Odziv 1
	maseni udio NA (% w/v)	koncentracija $CaCl_2$ (M)	vrijeme umrežavanja (min)	EE_{IG} (%)
1.	1,5	0,25	30	21,47
2.	4,5	0,05	30	37,96
3.	4,5	0,25	30	35,67
4.	1,5	0,15	50	25,23
5.	3,0	0,05	10	41,25
6.	3,0	0,05	50	27,82
7.	3,0	0,15	30	31,28
8.	3,0	0,25	10	37,03
9.	3,0	0,15	30	30,18
10.	3,0	0,15	30	30,96
11.	1,5	0,05	30	26,90
12.	1,5	0,15	10	37,80
13.	3,0	0,25	50	24,97
14.	4,5	0,15	10	53,67
15.	4,5	0,15	50	30,56

Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisne i nezavisnih varijabli. Model se sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli, pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ako nema značajnog utjecaja istraživanih faktora. Međutim, često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje. Zbog toga je provedena detaljnija statistička analiza (ANOVA) gdje se na osnovi više kriterija može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Kada su „ p “ vrijednosti za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 onda ti članovi statistički značajno utječu na promatrani proces. Prema tome, utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih podataka za EE_{IG} kvadratnim modelom statistički značajna što znači da je primjena modela opravdana za ispitivano područje čemu u prilog ide i visoka vrijednost koeficijenta multiple determinacije ($R^2 = 0,98$) kao pokazatelja slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka, a koji u idealnom slučaju iznosi 1. Pored toga statistički

parametar „nedostatak modela“ nije bio statistički značajan za $p < 0,05$ što dodatno potvrđuje prikladnost kvadratnog polinoma za opisivanje procesa inkapsulacije unutar eksperimentalnog područja (Tablica 4.6).

Tablica 4.6 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene EE_{IG} ukupnih fenolnih tvari iz CS ekstrakta, polinomnim modelom primjenom nelinearne regresije

Izvor varijabilnosti	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Model	892,96	9	99,22	31,48	0,0007 *
X_1 – maseni udio NA	269,61	1	269,61	85,55	0,0002 *
X_2 – koncentracija CaCl_2	27,32	1	27,32	8,67	0,0321 *
X_3 – vrijeme umrežavanja	467,75	1	467,75	148,41	< 0,0001 *
X_1X_2	2,46	1	2,46	0,78	0,4176
X_1X_3	27,77	1	27,77	8,81	0,0312 *
X_2X_3	0,4702	1	0,4702	0,15	0,7152
X_1^2	12,90	1	12,90	4,09	0,0989
X_2^2	17,53	1	17,53	5,56	0,0649
X_3^2	63,25	1	63,25	20,07	0,0065 *
Ostatak	15,76	5	3,15		
Nedostatak modela	15,11	3	5,04	15,55	0,0610
Pogreška	0,6477	2	0,3238		
R^2	0,98				

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; *df* – stupnjevi slobode; *MS* – varijanca; *F* – ANOVA koeficijent; *p* – *p* vrijednost; R^2 – koeficijent multiple determinacije; *utjecaj faktora je statistički značajan uz $p < 0,05$

Za slučaj ispitivanog procesa inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa bogatog fenolima kvadratni polinom prikazan je **jednadžbom (4.1)** koja sadrži samo statistički značajne regresijske koeficijente modela ($p < 0,05$) budući da samo oni utječu na odzivnu funkciju odnosno na EE_{IG} :

$$Y_{EE_{IG}} = 40,54 + 0,74X_1 + 26,06X_2 - 0,77X_3 + 0,01X_3^2 - 0,09X_1X_3 \quad (4.1)$$

gdje su:

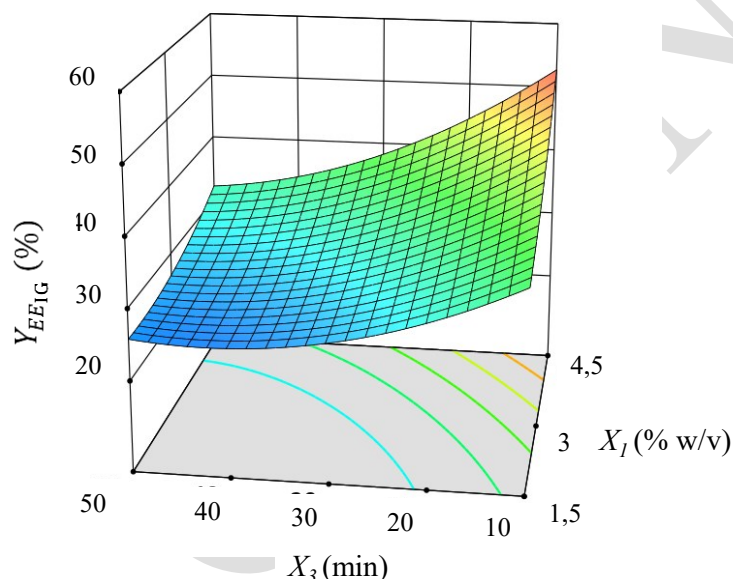
$Y_{EE_{IG}}$ – modelom predviđena učinkovitost inkapsulacije (%),

X_1 – ispitivani maseni udio NA (% w/v),

X_2 – ispitivana koncentracija CaCl_2 (M) i

X_3 – ispitivano vrijeme umrežavanja (min).

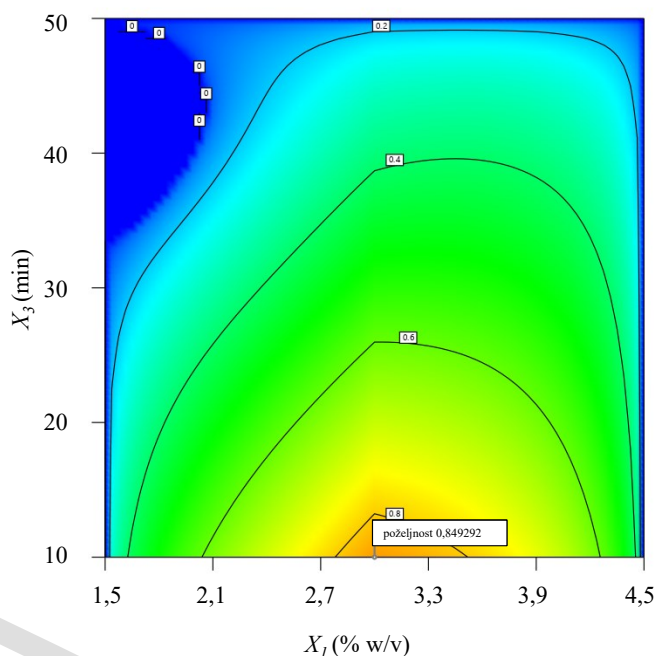
Pozitivan predznak regresijskog koeficijenta ukazuje na to da se s povećavanjem vrijednosti procesnog parametra povećava i vrijednost odzivne varijable dok negativan predznak ukazuje na to da se s povećavanjem vrijednosti procesnog parametra smanjuje vrijednost odzivne varijable. S obzirom na navedeno, iz **jednadžbe (4.1)** i **Tablice 4.6** vidljivo je da su na EE_{IG} fenolnih tvari iz ekstrakta tropa grožđa imali utjecaj sva tri ispitivana procesna parametra. Maseni udio NA i koncentracija CaCl_2 imali su statistički značajan utjecaj kao linearni članovi dok je vrijeme umrežavanja imalo najveći utjecaj na EE_{IG} budući da je dokazan statistički značajan utjecaj ovog parametra kao linearnog člana, kvadratnog člana te njegove interakcije s masenim udjelom NA.



Slika 4.3 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za učinkovitost inkapsulacije ($Y_{EE_{IG}}$) u ovisnosti o masenom udjelu natrij alginata (X_1) i vremenu umrežavanja (X_3) pri konstantnoj koncentraciji kalcij klorida od 0,15 M

Vizualni prikaz parametara koji značajno utječu na EE_{IG} fenolnih tvari dan je 3D dijagramom odzivne površine (**Slika 4.3**) gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđenu EE_{IG} ukupnih fenolnih tvari za ispitane kombinacije parametara. Iz dijagrama je vidljivo da porastom masenog udjela NA i smanjenjem vremena umrežavanja raste učinkovitost inkapsulacije. Iako povećanje masenog udjela NA rezultira većom učinkovitošću inkapsulacije zbog boljeg umrežavanja polimernih lanaca, njegova previsoka koncentracija dovodi do značajnog povećanja viskoznosti, što otežava rukovanje i proces inkapsulacije (Colin i sur., 2024). Stoga je dalje korištena niža koncentracija NA (3 %) kako bi se osigurala stabilnost provedbe procesa inkapsulacije.

U cilju određivanja optimalnih parametara za postizanje maksimalne EE_{IG} unutar ispitivanih parametara provedena je numerička optimizacija procesa s pomoću programa Design Expert 12. Pri tome je dobiveno više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih varijabli, međutim kao najbolje rješenje odabrani su oni procesni uvjeti kod kojih je „poželjnost“ kao kriterij za optimalno provođenje procesa, bio najbliže vrijednosti 1. Optimalno područje uvjeta inkapsulacije prikazano je grafički jednim konturnim dijagramom za odzivnu funkciju odnosno za EE_{IG} (Slika 4.4). Određeni optimalni uvjeti za inkapsulaciju fenolnih spojeva iz CS ekstrakta uz poželjnost 0,85 su: 3 % (w/v) NA, 0,25 M CaCl_2 i vrijeme umrežavanja 10 minuta. Ovi uvjeti su dalje korišteni u doktorskom radu za sve ostale eksperimente koji su provedeni na uređaju za inkapsulaciju Büchi B-390.



Slika 4.4 Optimalno područje (narančasto obojeno) ispitivanih procesnih uvjeta inkapsulacije (maseni udio natrij alginata: 3 % (w/v), vrijeme umrežavanja 10 minuta pri konstantnoj koncentraciji kalcij klorida: 0,25 M) za dobivanje maksimalne EE_{IG} ekstrakta CS bogatog fenolnim spojevima

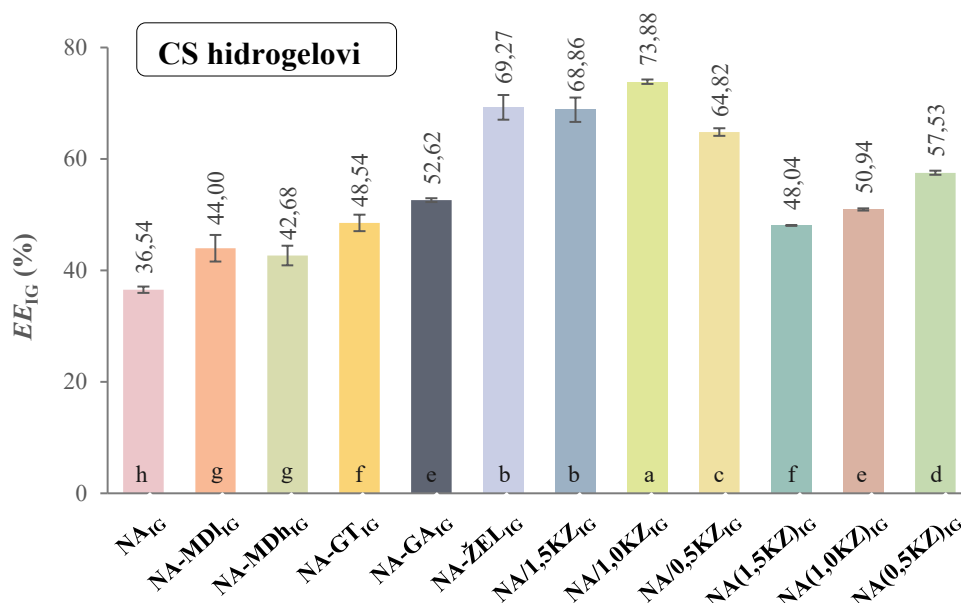
4.4.2. Karakterizacija inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova

Pri utvrđenim optimalnim uvjetima inkapsulacije CS ekstrakta provedena je inkapsulacija ionskim geliranjem pomoću 12 omotača (natrij alginat i njegove kombinacije s maltodekstrinima, gumama arabika i tragacanth, želatinom te kitozanom), koji su zajedno s njihovim koncentracijama navedeni u **Tablicama 3.7 i 3.8**, na uređaju za inkapsulaciju Büchi B-390 pri čemu su dobiveni inkapsulati u obliku hidrogelova. Hidrogelovi su podvrgnuti

fizikalno-kemijskoj i funkcionalnoj karakterizaciji pri čemu je analizirana EE_{IG} , geometrijski parametri (veličina i oblik) i tekstura. Budući da hidrogelovi vežu vodu koja se s vremenom otpušta, oni često nisu dugo stabilni i skloni su kvarenju što ograničava njihovu daljnju primjenu u tom obliku. Zbog toga su ispitane tri metode sušenja kao načini stabilizacije hidrogelova uključujući sušenje na zraku, sušenje pod vakuumom i sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) pri čemu su dobiveni stabilniji suhi inkapsulati. Suhi inkapsulati su također okarakterizirani s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva kao i hidrogelovi, ali je kod njih dodatno ispitana morfologija SEM analizom i funkcionalno svojstvo inkapsulata odnosno profil *in vitro* otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata tijekom simulirane probave bez enzima. Temeljem dobivenih rezultata procijenjen je utjecaj korištenih omotača i metode sušenja hidrogelova na ispitivana svojstva inkapsulata.

4.4.2.1. Učinkovitost inkapsulacije ionskim geliranjem – utjecaj omotača

Cilj ovog dijela istraživanja bio je utvrditi utjecaj omotača za inkapsulaciju na EE_{IG} . Rezultati za EE_{IG} ekstrakata CS dobiveni uz primjenu 12 različitih omotača baziranih na omotaču NA dobiveni su izračunavanjem prema **izrazu (3.26)**, a prikazani su na **Slici 4.5**. Upotrebom samo NA_{IG} kao omotača ostvarena je najniža vrijednost EE_{IG} od 36,54 %. Kada su maltodekstrini kombinirani s NA_{IG} , EE_{IG} se statistički značajno povećala (ANOVA i Duncanov test, $p < 0,05$) te je iznosila 44,00 % kada je korišten maltodekstrin s nižim dekstroznim ekvivalentom ($NA-MDl_{IG}$) i 42,86 % kada je upotrijebljen maltodekstrin s višim dekstroznim ekvivalentom ($NA-MDh_{IG}$). Međutim, rezultati EE_{IG} dobiveni korištenjem ova dva maltodekstrina nisu se statistički značajno razlikovali, iako je postignut nešto bolji rezultat s maltodekstrinom nižeg dekstroznog ekvivalenta. Niži dekstrozni ekvivalent ukazuje na manji stupanj hidrolize škroba i veće molekule koje stvaraju pogodni sustav za inkapsulaciju fenolnih spojeva (Laine i sur., 2008).



Slika 4.5 Učinkovitost inkapsulacije ionskim geliranjem (EE_{IG} , %) CS ekstrakta pomoću različitih omotača (NA_{IG} – natrijev alginat i kombinacije NA sa: maltodekstrinom (dekstroznog ekvivalenta 4 – 7) – NA-MDI_{IG}, maltodekstrinom (dekstroznog ekvivalenta 16,5 – 19,5) – NA-MDh_{IG}, gumom tragacanth – NA-GT_{IG}, gumom arabikom – NA-GA_{IG}, želatinom – NA-ŽEL_{IG}, s kitozanom (KZ) otopljenim u otopini za umrežavanje u različitim koncentracijama: NA/1,5KZ_{IG} – 1,5 % (w/v), NA/1,0KZ_{IG} – 1,0 % (w/v), NA/0,5KZ_{IG} – 0,5 % (w/v) te s KZ kada su alginatni hidrogelovi uranjeni u KZ otopine različitih koncentracija: NA(1,5KZ)_{IG} – 1,5 % (w/v), NA(1,0KZ)_{IG} – 1,0 % (w/v), NA(0,5KZ)_{IG} – 0,5 % (w/v)). Različita abecedna slova označavaju statistički značajnu razliku u EE_{IG} prema jednosmjernom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu, $p < 0,05$)

Upotreba kombinacije NA_{IG} s gumom tragacanth (NA-GT_{IG}) i gumom arabikom (NA-GA_{IG}) pridonijela je daljnjem značajnom poboljšanju EE_{IG} , postizujući vrijednosti od 48,54 % odnosno 52,62 %. Kada se koristi kombinacija omotača za inkapsulaciju od velike su važnosti koncentracija i omjer kombiniranih omotača. Na primjer, Apoorva i sur. (2020) istraživali su utjecaj različitih omjera (100 : 0; 67 : 33; 50 : 50; 33 : 67) 2 % (w/v) NA i 2 % (w/v) GT na EE fenolnih spojeva ekstrahiranih iz biljke roda *Basella* koristeći metodu ionskog geliranja. Dobivene vrijednosti EE iznosile su između 70 – 82 %, pri čemu je povećanje udjela alginata rezultiralo proporcionalnim povećanjem EE . Nadalje, EE_{IG} postignuta pomoću kombinacije omotača NA-GA_{IG} u ovom doktorskom radu usporediva je s drugim objavljenim rezultatima u dostupnoj literaturi. Primjerice, Li i sur. (2021) inkapsulirali su fenolne spojeve čaja uz upotrebu 2 % NA i 2 % GA u omjeru 80 : 20 te su postigli EE od 48,56 %. Osim koncentracije omotača i struktura omotača ima važnu ulogu u procesu inkapsulacije. Primjerice, GT pretežito sadrži razgranate polisaharide u svojoj strukturi, dok je GA kompleksna mješavina polisaharida, glikoproteina i drugih spojeva s visoko razgranatom strukturom (Dos Santos i Grenha, 2015). Struktura GA, zajedno s njezinim funkcionalnim skupinama, potiče povoljne interakcije s fenolnim spojevima (Mateus i sur., 2004) i zadržava ih u strukturi hidrogelova. Slične

interakcije s fenolnim spojevima stvaraju i proteini kao što je želatina kroz različite vrste veza, uključujući vodikove veze, elektrostatske i hidrofobne interakcije (Shahidi i Dissanayaka, 2023a), što znatno poboljšava EE . Kao što je prikazano na **Slici 4.5**, dodatak želatine natrijevom alginatu (NA-ŽEL_{IG}) rezultirao je značajnim povećanjem EE_{IG} dostižući vrijednost od 69,27 %.

Kada se kitozan (KZ) koristio u kombinaciji s NA, otapao se u otopini za umrežavanje ($CaCl_2$) u tri različite koncentracije (1,5 % (w/v) – NA/1,5KZ_{IG}; 1,0 % (w/v) – NA/1,0KZ_{IG} i 0,5 % (w/v) – NA/0,5KZ_{IG}), a dobiveni EE_{IG} iznosio je od 64,82 % do 73,88 %. Među ovim kombinacijama omotača najveća EE_{IG} je postignuta primjenom kombinacije omotača NA/1,0KZ_{IG}. Kada se KZ koristi na ovaj način za inkapsulaciju odnosno miješanjem s otopinom za umrežavanje, omogućuje se njegova trenutačna integracija i dobra distribucija u strukturi hidrogela. Uranjanjem alginatnih hidrogelova u otopine KZ različitih koncentracija (1,5 % (w/v) – NA(1,5KZ)_{IG}; 1,0 % (w/v) – NA(1,0KZ)_{IG} i 0,5 % (w/v) – NA(0,5KZ)_{IG}), dobivene su niže vrijednosti za EE_{IG} (48,04 % – 57,53 %) u usporedbi s prethodno opisanim načinom upotrebe KZ. Kada je koncentracija KZ u otopini visoka, kitozan ima sklonost taloženju, što može uzrokovati smanjenje učinkovitosti inkapsulacije (Takka i Gürel, 2010). Općenito, KZ kao omotač ima pozitivan naboj zbog prisutnosti amino skupina, dok fenolni spojevi često imaju negativan naboj pri čemu ova elektrostatska privlačnost doprinosi poboljšanju EE (Moschona i Liakopoulou-Kyriakides, 2018).

4.4.2.2. Veličina, oblik i morfologija inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova

Analizom rezultata parametara veličine (površina, opseg, maksimalni i minimalni Feret) i oblika (kružnost, zaobljenost, ujednačenost površine), koji su prikazani u **Tablicama 4.7 – 4.13**, utvrđeno je da su korišteni omotači imali statistički značajan utjecaj (ANOVA, Duncanov *post-hoc* test, $p < 0,05$) na ispitivane parametre veličine i oblika hidrogelova.

Ako se promatraju isključivo hidrogelovi, primjetno je da su korištenjem samo jednog omotača, tj. NA_{IG}, dobiveni hidrogelovi s najmanjom površinom (11,84 mm²), opsegom (13,21 mm) te najmanjim vrijednostima za maksimalni Feret (4,24 mm) i minimalni Feret (3,65 mm) koje odgovaraju duljini i širini hidrogelova (**Tablice 4.7 – 4.10**). Dodavanje dodatnog omotača natrij alginatu rezultiralo je povećanjem ovih vrijednosti za dobivene hidrogelove. Najveće vrijednosti izmjerene su za NA/1,5KZ_{IG} hidrogelove čija je površina iznosila 19,32 mm²

(Tablica 4.7), opseg 17,91 mm (Tablica 4.8), maksimalan Feret 6,65 mm (Tablica 4.9) i minimalni Feret 3,89 mm (Tablica 4.10).

Tablica 4.7 Površina CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zraku ^C	Sušenje pod vakuumom ^C	Sušenje zamrzavanjem ^B
		Površina (mm ²)		
NA _{IG}	11,84 ± 0,77 ^f	1,91 ± 0,22 ^e	2,11 ± 0,24 ^e	4,50 ± 1,15 ^f
NA-MD _{IG}	13,25 ± 1,00 ^e	2,19 ± 0,32 ^c	2,68 ± 0,39 ^b	6,60 ± 0,95 ^e
NA-MDh _{IG}	13,08 ± 0,98 ^e	2,04 ± 0,26 ^{de}	2,46 ± 0,30 ^{cd}	6,17 ± 1,12 ^e
NA-GT _{IG}	13,31 ± 1,16 ^e	2,16 ± 0,31 ^{cd}	1,92 ± 0,20 ^f	6,35 ± 1,10 ^e
NA-GA _{IG}	14,61 ± 0,90 ^d	2,26 ± 0,20 ^{bc}	2,34 ± 0,20 ^d	10,12 ± 0,78 ^a
NA-ŽEL _{IG}	16,56 ± 1,06 ^c	2,87 ± 0,23 ^a	3,36 ± 0,43 ^a	10,26 ± 0,80 ^a
NA/1,5KZ _{IG}	19,32 ± 1,90 ^a	2,27 ± 0,46 ^{bc}	2,51 ± 0,48 ^c	10,54 ± 1,97 ^a
NA/1,0KZ _{IG}	17,46 ± 1,52 ^b	2,14 ± 0,24 ^{cd}	2,38 ± 0,32 ^{cd}	8,45 ± 1,39 ^{bc}
NA/0,5KZ _{IG}	17,78 ± 1,32 ^b	2,36 ± 0,35 ^b	2,33 ± 0,35 ^d	8,88 ± 1,17 ^b
NA(1,5KZ) _{IG}	14,66 ± 0,87 ^d	1,59 ± 0,18 ^f	1,89 ± 0,26 ^f	8,16 ± 1,47 ^{cd}
NA(1,0KZ) _{IG}	13,09 ± 0,82 ^e	1,43 ± 0,11 ^g	1,66 ± 0,17 ^g	6,22 ± 1,11 ^e
NA(0,5KZ) _{IG}	13,24 ± 0,66 ^e	1,56 ± 0,25 ^{fg}	1,57 ± 0,18 ^g	7,71 ± 1,43 ^d

NA_{IG} – natrijev alginat, kombinacije natrij alginata sa: maltodekstrinom dekstroznog ekvivalenta 4 – 7 – NA-MD_{IG}; maltodekstrinom dekstroznog ekvivalenta 16,5 – 19,5 – NA-MDh_{IG}; gumom tragacanth – NA-GT_{IG}; gumom arabikom – NA-GA_{IG}; želatinom – NA-ŽEL_{IG}; s kitozonom (KZ) otopljenim u otopini za umrežavanje u različitim koncentracijama: NA/1,5KZ_{IG} – 1,5 % (w/v), NA/1,0KZ_{IG} – 1,0 % (w/v), NA/0,5KZ_{IG} – 0,5 % (w/v) te s KZ kada su alginatni hidrogelovi uranjeni u otopinu KZ različitih koncentracija: NA(1,5KZ)_{IG} – 1,5 % (w/v), NA(1,0KZ)_{IG} – 1,0 % (w/v), NA(0,5KZ)_{IG} – 0,5 % (w/v)). Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov *post-hoc* test, $p < 0,05$).

Tablica 4.8 Opseg CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zraku ^D	Sušenje pod vakuumom ^C	Sušenje zamrzavanjem ^B
		Opseg (mm)		
NA _{IG}	13,21 ± 0,51 ^h	5,21 ± 0,30 ^f	5,57 ± 0,34 ^g	8,57 ± 0,84 ^f
NA-MD _{IG}	14,13 ± 0,78 ^{ef}	5,59 ± 0,40 ^{de}	6,58 ± 0,82 ^c	10,32 ± 0,88 ^e
NA-MDh _{IG}	13,71 ± 0,54 ^{fg}	5,42 ± 0,36 ^{ef}	6,01 ± 0,39 ^{ef}	10,27 ± 1,35 ^e
NA-GT _{IG}	14,03 ± 0,82 ^{fg}	5,82 ± 0,57 ^{cd}	5,20 ± 0,27 ^{hi}	10,17 ± 0,88 ^e
NA-GA _{IG}	14,50 ± 0,46 ^{de}	5,70 ± 0,30 ^{cd}	5,92 ± 0,30 ^f	13,46 ± 1,08 ^b
NA-ŽEL _{IG}	16,09 ± 1,15 ^c	6,56 ± 0,65 ^a	7,29 ± 0,45 ^a	13,45 ± 0,72 ^b
NA/1,5KZ _{IG}	17,91 ± 1,04 ^a	6,20 ± 0,55 ^b	6,85 ± 0,77 ^b	14,56 ± 1,94 ^a
NA/1,0KZ _{IG}	16,74 ± 1,25 ^b	5,87 ± 0,36 ^c	6,49 ± 0,55 ^{cd}	12,28 ± 1,30 ^c
NA/0,5KZ _{IG}	16,57 ± 0,97 ^b	6,42 ± 0,98 ^{ab}	6,25 ± 0,81 ^{de}	12,91 ± 1,53 ^b
NA(1,5KZ) _{IG}	14,61 ± 0,55 ^d	4,80 ± 0,28 ^g	5,28 ± 0,32 ^h	11,63 ± 1,14 ^d
NA(1,0KZ) _{IG}	13,65 ± 0,44 ^g	4,56 ± 0,23 ^g	4,98 ± 0,31 ^{ij}	10,20 ± 0,96 ^e
NA(0,5KZ) _{IG}	13,78 ± 0,69 ^{fg}	4,70 ± 0,34 ^g	4,49 ± 0,29 ^j	11,24 ± 1,05 ^d

Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C, D) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov test, $p < 0,05$).

Tablica 4.9 Maksimalni Feret, odnosno duljina CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zrak ^D	Sušenje pod vakuumom ^C	Sušenje zamrzavanjem ^B
		Feret _{MAX} (mm)		
NA _{IG}	4,24 ± 0,19 ^g	1,72 ± 0,09 ^f	1,85 ± 0,14 ^f	2,84 ± 0,26 ^e
NA-MD _{IG}	4,46 ± 0,24 ^{ef}	1,82 ± 0,14 ^{de}	2,09 ± 0,15 ^d	3,30 ± 0,28 ^d
NA-MDh _{IG}	4,34 ± 0,20 ^{fg}	1,78 ± 0,12 ^{ef}	1,97 ± 0,12 ^e	3,28 ± 0,35 ^d
NA-GT _{IG}	4,41 ± 0,26 ^{fg}	1,93 ± 0,15 ^c	1,70 ± 0,09 ^{gh}	3,30 ± 0,28 ^d
NA-GA _{IG}	4,62 ± 0,15 ^e	1,88 ± 0,09 ^{cd}	1,96 ± 0,11 ^e	4,12 ± 0,28 ^b
NA-ŽEL _{IG}	4,99 ± 0,39 ^d	2,11 ± 0,13 ^b	2,40 ± 0,13 ^b	4,11 ± 0,33 ^b
NA/1,5KZ _{IG}	6,65 ± 0,59 ^a	2,35 ± 0,22 ^a	2,57 ± 0,34 ^a	5,06 ± 0,66 ^a
NA/1,0KZ _{IG}	5,94 ± 0,78 ^b	2,13 ± 0,20 ^b	2,36 ± 0,27 ^b	4,01 ± 0,47 ^b
NA/0,5KZ _{IG}	5,55 ± 0,58 ^c	2,19 ± 0,32 ^b	2,22 ± 0,37 ^c	4,22 ± 0,71 ^b
NA(1,5KZ) _{IG}	4,63 ± 0,18 ^e	1,61 ± 0,07 ^g	1,78 ± 0,13 ^{fg}	3,70 ± 0,33 ^c
NA(1,0KZ) _{IG}	4,37 ± 0,13 ^{fg}	1,51 ± 0,07 ^h	1,65 ± 0,10 ^{hi}	3,41 ± 0,26 ^d
NA(0,5KZ) _{IG}	4,37 ± 0,15 ^{fg}	1,56 ± 0,11 ^{gh}	1,59 ± 0,08 ⁱ	3,68 ± 0,35 ^c

Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C, D) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov test, $p < 0,05$)

Tablica 4.10 Minimalni Feret, odnosno širina CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zrak ^D	Sušenje pod vakuumom ^C	Sušenje zamrzavanjem ^B
		Feret _{MIN} (mm)		
NA _{IG}	3,65 ± 0,18 ^e	1,48 ± 0,13 ^d	1,54 ± 0,12 ^d	2,17 ± 0,30 ^e
NA-MD _{IG}	3,88 ± 0,24 ^d	1,58 ± 0,13 ^{bc}	1,72 ± 0,17 ^b	2,67 ± 0,23 ^{cd}
NA-MDh _{IG}	3,91 ± 0,22 ^d	1,52 ± 0,11 ^{cd}	1,67 ± 0,13 ^{bc}	2,57 ± 0,28 ^d
NA-GT _{IG}	3,91 ± 0,21 ^d	1,52 ± 0,15 ^{cd}	1,48 ± 0,08 ^{de}	2,61 ± 0,28 ^d
NA-GA _{IG}	4,11 ± 0,19 ^b	1,61 ± 0,09 ^b	1,63 ± 0,10 ^c	3,34 ± 0,22 ^a
NA-ŽEL _{IG}	4,39 ± 0,16 ^a	1,81 ± 0,10 ^a	1,89 ± 0,22 ^a	3,38 ± 0,19 ^a
NA/1,5KZ _{IG}	3,89 ± 0,33 ^d	1,31 ± 0,20 ^f	1,34 ± 0,19 ^f	2,99 ± 0,39 ^b
NA/1,0KZ _{IG}	4,04 ± 0,25 ^{bc}	1,41 ± 0,16 ^e	1,43 ± 0,17 ^e	2,98 ± 0,30 ^b
NA/0,5KZ _{IG}	4,32 ± 0,29 ^a	1,54 ± 0,16 ^{bcd}	1,49 ± 0,17 ^{de}	2,98 ± 0,30 ^b
NA(1,5KZ) _{IG}	4,13 ± 0,22 ^b	1,33 ± 0,09 ^f	1,44 ± 0,13 ^e	2,99 ± 0,29 ^b
NA(1,0KZ) _{IG}	3,88 ± 0,17 ^d	1,27 ± 0,07 ^f	1,36 ± 0,10 ^f	2,52 ± 0,34 ^d
NA(0,5KZ) _{IG}	3,93 ± 0,16 ^{cd}	1,34 ± 0,11 ^f	1,32 ± 0,11 ^f	2,82 ± 0,34 ^c

Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C, D) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov test, $p < 0,05$)

U slučaju suhih inkapsulata, korišteni omotači i metoda sušenja utjecali su na promatrane geometrijske parametre pojedinačno ili u interakciji budući da je svaka metoda sušenja u kombinaciji s pojedinačnim omotačima imala različit utjecaj na veličinu i oblik suhih inkapsulata.

Proces sušenja uzrokovao je uklanjanje određene količine vlage iz hidrogelova, što je značajno smanjilo veličinu suhih inkapsulata. U usporedbi s hidrogelovima, najmanje promjene u parametrima veličine suhih inkapsulata vidljive su nakon sušenja zamrzavanjem, dok su najveće promjene zabilježene kod inkapsulata sušenih na zraku. Konkretno, smanjenje površine inkapsulata nakon sušenja zamrzavanjem u odnosu na hidrogelove kretalo se od 31 % (NA-GA_{IG}) do 62 % (NA_{IG}), što je bilo statistički manje značajno ($p < 0,05$) u usporedbi sa smanjenjem površine zabilježene nakon sušenja pod vakuumom, koje se kretalo od 80 % (NA-MD_{IG}, NA-ŽEL_{IG}) do 88 % (NA(0,5KZ)_{IG}) te nakon sušenja na zraku gdje se smanjenje kretalo od 83 % (NA-MD_{IG}, NA-ŽEL_{IG}) do 89 % (NA(1,5KZ)_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG}) (**Tablica 4.7**). Sličan trend uočen je u smanjenju opsega suhih inkapsulata u usporedbi s hidrogelovima (**Tablica 4.8**), gdje je najmanje smanjenje opsega uočeno nakon sušenja zamrzavanjem u rasponu od 7 % (NA-GA_{IG}) do 35 % (NA_{IG}), dok je značajnije smanjenje opsega zabilježeno nakon sušenja pod vakuumom, u rasponu od 53 % (NA-MD_{IG}) do 67 % (NA(0,5KZ)_{IG}), a najveće smanjenje u opsegu uočeno je kod inkapsulata dobivenih sušenjem na zraku u rasponu od 59 % (NA-GT_{IG}) do 67 % (NA(1,5KZ)_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG}). Vrijednosti maksimalnog Fereta, odnosno duljine suhih inkapsulata prikazane u **Tablici 4.9** ukazuju da su najveće vrijednosti zabilježene kod suhih NA/1,5KZ_{IG} inkapsulata, bez obzira na korištenu metodu sušenja. Nadalje, suhi inkapsulati NA-ŽEL_{IG} su pokazivali najmanje vrijednosti za minimalni Feret za sve metode sušenja (**Tablica 4.10**).

Kao što je već navedeno, metoda sušenja i korišteni omotač(i), kao i njihove međusobne interakcije, imali su statistički značajan ($p < 0,05$) utjecaj na parametre oblika – kružnost, zaobljenost i ujednačenost površine suhih inkapsulata (**Tablice 4.11 – 4.13**), dok je korišteni omotač utjecao na navedene parametre oblika kod hidrogelova.

Tablica 4.11 prikazuje rezultate kružnosti hidrogelova i suhih inkapsulata. Kružnost je mjera kojom se oblik analizirane čestice uspoređuje sa savršenim krugom, a vrijednosti se kreću u rasponu od 0 do 1. Što su vrijednosti bliže 1, analizirana čestica je sličnija savršenom krugu (Ferreira i Rasband, 2012). Hidrogelovi i inkapsulati sušeni na zraku imali su najmanje odstupanje od pravilnog oblika kruga, s vrijednostima kružnosti u rasponu od 0,76 (NA/1,5KZ_{IG}) do 0,88 (NA(1,0KZ)_{IG}, NA(0,5KZ)_{IG}) za hidrogelove, a od 0,74 (NA/1,5KZ_{IG}, NA/0,5KZ_{IG}) do 0,89 (NA(0,5KZ)_{IG}) za inkapsulate sušene na zraku. Sušenje pod vakuumom, dalo je inkapsulate s nižim vrijednostima kružnosti (0,68 – 0,89), dok su inkapsulati sušeni zamrzavanjem imali najveće odstupanje od savršenog oblika kruga s vrijednostima kružnosti u rasponu od 0,63 (NA/1,5KZ_{IG}) do 0,78 (NA-MD_{IG}).

Tablica 4.11 Kružnost CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zraku ^A	Sušenje pod vakuumom ^B	Sušenje zamrzavanjem ^C
		Kružnost (-)		
NA _{IG}	0,85 ± 0,04 ^{bc}	0,88 ± 0,04 ^a	0,85 ± 0,05 ^{ab}	0,76 ± 0,07 ^{ab}
NA-MD _{IG}	0,84 ± 0,06 ^{cd}	0,88 ± 0,04 ^a	0,79 ± 0,11 ^c	0,78 ± 0,06 ^a
NA-MDh _{IG}	0,87 ± 0,02 ^{ab}	0,87 ± 0,05 ^a	0,86 ± 0,04 ^{ab}	0,74 ± 0,12 ^{abc}
NA-GT _{IG}	0,85 ± 0,05 ^{bc}	0,81 ± 0,07 ^b	0,89 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,07 ^a
NA-GA _{IG}	0,87 ± 0,02 ^{ab}	0,87 ± 0,04 ^a	0,84 ± 0,05 ^b	0,71 ± 0,08 ^{cd}
NA-ŽEL _{IG}	0,81 ± 0,07 ^{ef}	0,85 ± 0,10 ^a	0,79 ± 0,06 ^c	0,72 ± 0,06 ^{bcd}
NA/1,5KZ _{IG}	0,76 ± 0,04 ^g	0,74 ± 0,07 ^c	0,68 ± 0,09 ^e	0,63 ± 0,11 ^e
NA/1,0KZ _{IG}	0,79 ± 0,07 ^f	0,78 ± 0,06 ^b	0,71 ± 0,10 ^d	0,71 ± 0,08 ^{cd}
NA/0,5KZ _{IG}	0,82 ± 0,06 ^{de}	0,74 ± 0,12 ^c	0,76 ± 0,10 ^c	0,68 ± 0,10 ^d
NA(1,5KZ) _{IG}	0,86 ± 0,03 ^{ab}	0,87 ± 0,05 ^a	0,85 ± 0,05 ^{ab}	0,76 ± 0,06 ^{ab}
NA(1,0KZ) _{IG}	0,88 ± 0,01 ^a	0,87 ± 0,06 ^a	0,85 ± 0,06 ^b	0,75 ± 0,07 ^{abc}
NA(0,5KZ) _{IG}	0,88 ± 0,05 ^{ab}	0,89 ± 0,03 ^a	0,86 ± 0,03 ^{ab}	0,76 ± 0,07 ^a

Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov test, $p < 0,05$)

Tablica 4.12 Zaobljenost CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zraku ^B	Sušenje pod vakuumom ^C	Sušenje zamrzavanjem ^C
		Zaobljenost (-)		
NA _{IG}	0,89 ± 0,06 ^a	0,88 ± 0,08 ^a	0,86 ± 0,08 ^{ab}	0,79 ± 0,09 ^{bcd}
NA-MD _{IG}	0,89 ± 0,05 ^a	0,89 ± 0,07 ^a	0,83 ± 0,08 ^{bc}	0,84 ± 0,07 ^{ab}
NA-MDh _{IG}	0,91 ± 0,05 ^a	0,87 ± 0,06 ^a	0,87 ± 0,07 ^{ab}	0,80 ± 0,09 ^{abc}
NA-GT _{IG}	0,90 ± 0,06 ^a	0,80 ± 0,08 ^b	0,89 ± 0,05 ^a	0,81 ± 0,08 ^{abc}
NA-GA _{IG}	0,91 ± 0,05 ^a	0,88 ± 0,05 ^a	0,86 ± 0,07 ^{ab}	0,83 ± 0,09 ^{ab}
NA-ŽEL _{IG}	0,90 ± 0,06 ^a	0,87 ± 0,06 ^a	0,80 ± 0,11 ^c	0,85 ± 0,08 ^a
NA/1,5KZ _{IG}	0,59 ± 0,09 ^d	0,56 ± 0,09 ^e	0,52 ± 0,12 ^f	0,60 ± 0,11 ^e
NA/1,0KZ _{IG}	0,70 ± 0,11 ^c	0,68 ± 0,12 ^d	0,62 ± 0,12 ^e	0,79 ± 0,12 ^{bcd}
NA/0,5KZ _{IG}	0,81 ± 0,11 ^b	0,74 ± 0,13 ^c	0,70 ± 0,16 ^d	0,74 ± 0,14 ^d
NA(1,5KZ) _{IG}	0,92 ± 0,05 ^a	0,85 ± 0,06 ^a	0,83 ± 0,09 ^{bc}	0,83 ± 0,07 ^{ab}
NA(1,0KZ) _{IG}	0,90 ± 0,04 ^a	0,86 ± 0,07 ^a	0,84 ± 0,09 ^{abc}	0,76 ± 0,12 ^{cd}
NA(0,5KZ) _{IG}	0,91 ± 0,04 ^a	0,88 ± 0,06 ^a	0,85 ± 0,08 ^{abc}	0,78 ± 0,10 ^{bcd}

Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov test, $p < 0,05$)

Zakrivljenost rubova i kutova hidrogelova i suhih inkapsulata, definirana kao zaobljenost prikazana je u **Tablici 4.12**. Za sve tri metode sušenja zabilježeno je smanjenje zaobljenosti suhih inkapsulata u usporedbi s hidrogelovima. Zaobljenost hidrogelova iznosila je između 0,59 i 0,91 dok su nakon sušenja na zraku, vrijednosti zaobljenosti inkapsulata iznosili u rasponu od

0,56 do 0,88. Najveće odstupanje u vrijednostima zaobljenosti u usporedbi s hidrogelovima uočeno je kod inkapsulata sušenih pod vakuumom i zamrzavanjem, gdje su vrijednosti zaobljenosti iznosile od 0,52 do 0,89.

Tablica 4.13 Ujednačenost površine CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi A	Suhi inkapsulati		
		Sušenje na zraku ^B	Sušenje pod vakuumom ^C	Sušenje zamrzavanjem ^C
	Ujednačenost površine (-)			
NA _{IG}	0,98 ± 0,00 ^{ab}	0,96 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,01 ^{abc}	0,94 ± 0,03 ^{bc}
NA-MD _{IG}	0,98 ± 0,01 ^{bc}	0,97 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,03 ^{cd}	0,96 ± 0,01 ^a
NA-MD _{hIG}	0,98 ± 0,00 ^a	0,96 ± 0,02 ^{ab}	0,96 ± 0,01 ^{ab}	0,95 ± 0,03 ^{ab}
NA-GT _{IG}	0,98 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,02 ^{bc}	0,97 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,02 ^a
NA-GA _{IG}	0,98 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,01 ^{bc}	0,96 ± 0,01 ^a
NA-ŽEL _{IG}	0,97 ± 0,02 ^c	0,96 ± 0,02 ^a	0,95 ± 0,02 ^{bc}	0,96 ± 0,01 ^a
NA/1,5KZ _{IG}	0,97 ± 0,01 ^c	0,94 ± 0,02 ^c	0,93 ± 0,03 ^e	0,93 ± 0,03 ^c
NA/1,0KZ _{IG}	0,97 ± 0,02 ^c	0,95 ± 0,01 ^c	0,92 ± 0,03 ^e	0,94 ± 0,02 ^{bc}
NA/0,5KZ _{IG}	0,98 ± 0,01 ^{bc}	0,93 ± 0,04 ^d	0,94 ± 0,03 ^d	0,94 ± 0,03 ^{bc}
NA(1,5KZ) _{IG}	0,98 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,02 ^{ab}	0,96 ± 0,02 ^{abc}	0,96 ± 0,01 ^a
NA(1,0KZ) _{IG}	0,98 ± 0,00 ^a	0,96 ± 0,01 ^{ab}	0,96 ± 0,01 ^{abc}	0,95 ± 0,01 ^{ab}
NA(0,5KZ) _{IG}	0,98 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,01 ^{ab}	0,96 ± 0,01 ^{abc}	0,96 ± 0,01 ^a

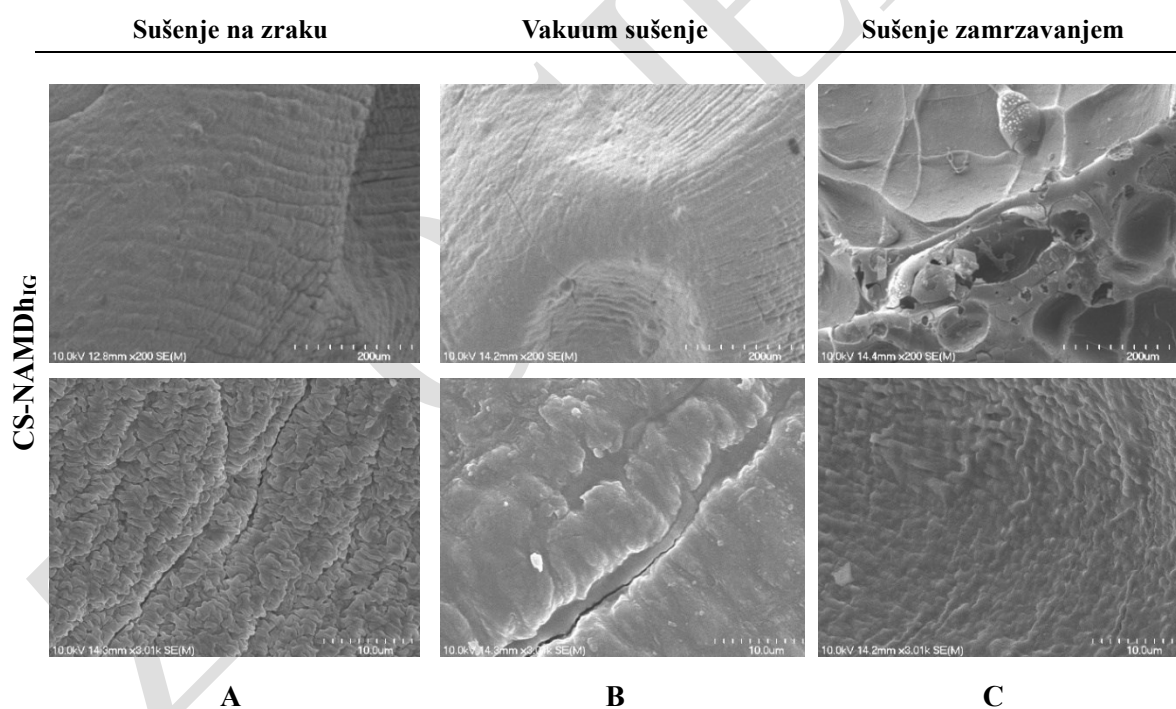
Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test, Duncanov test, $p < 0,05$)

Tablica 4.13 prikazuje parametar ujednačenosti površine ispitivanih uzoraka. Ujednačenost površine je parametar oblika koji odražava kompaktnost čestice, a izražava se u rasponu od 0 do 1, pri čemu 1 označava izrazito kompaktnu česticu (Ferreira i Rasband, 2012). Za hidrogelove, ujednačenost površine kretala se između 0,97 i 0,98. Međutim, nakon sušenja, te vrijednosti su se smanjile, što ukazuje na odstupanje od pravilnih oblika i prisutnosti šupljina u uzorcima. Unatoč tome, nakon sušenja, vrijednosti ujednačenosti površine ostale su u rasponu od 0,92 do 0,97, ali je dokazana statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u usporedbi s hidrogelovima gdje su veća odstupanja od hidrogelova zabilježena kod inkapsulata sušenih pod vakuumom i zamrzavanjem u odnosu na inkapsulate sušene na zraku. Kako se ujednačenost površine odnosi isključivo na rubove i obrise analiziranih čestica (u ovom slučaju na hidrogelove i suhe inkapsulate) daljina istraživanja morfologije suhih inkapsulata provedena su pomoću SEM-a.

S obzirom na sve utvrđene parametre oblika (**Tablice 4.11 – 4.13**), općenito se može zaključiti da je najnepravilniji oblik hidrogelova i suhih inkapsulata uočen upotrebom kombinacije

omotača NA-KZ_{IG}, ali kada je KZ dodan u otopini za umrežavanje (CaCl₂). Nepravilnost parametara oblika čestica postajala je izraženija kako se povećavala koncentracija kitozana.

Morfologija svih suhih CS inkapsulata istražena je SEM-om čije su slike prikazane u **Prilozima (Slika P1.1)**, a u nastavku je prikazana morfologija reprezentativnih uzoraka inkapsulata: NA-MDh_{IG} (**Slika 4.6**), te NA/1,5KZ_{IG} – NA/0,5KZ_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG} – NA(0,5KZ)_{IG} (**Slike 4.7 i 4.8**). Inkapsulati NA-MDh_{IG} dobiveni sušenjem na zraku imali su površinske brazde, pukotine i nabranu površinu (**Slika 4.6 A**), što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Saarai i sur. (2013). Međutim, te značajke su bile manje izražene kod sušenja pod vakuumom (**Slika 4.6 B**), što se podudara s rezultatima istraživanja drugih znanstvenika (Anbinder i sur., 2011; Keskin i sur., 2019). U slučaju inkapsulata sušenih zamrzavanjem uočena su površinska udubljenja, što je također u skladu s drugim literaturnim izvorima (Biswas i sur., 2015; Dadwal i sur., 2020) (**Slika 4.6 C**).

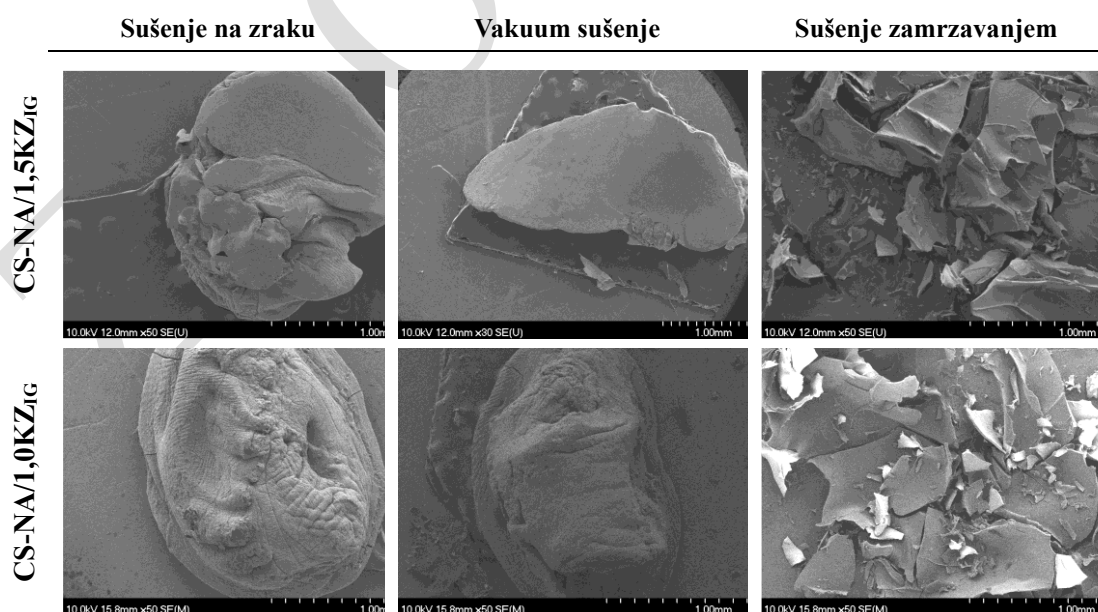


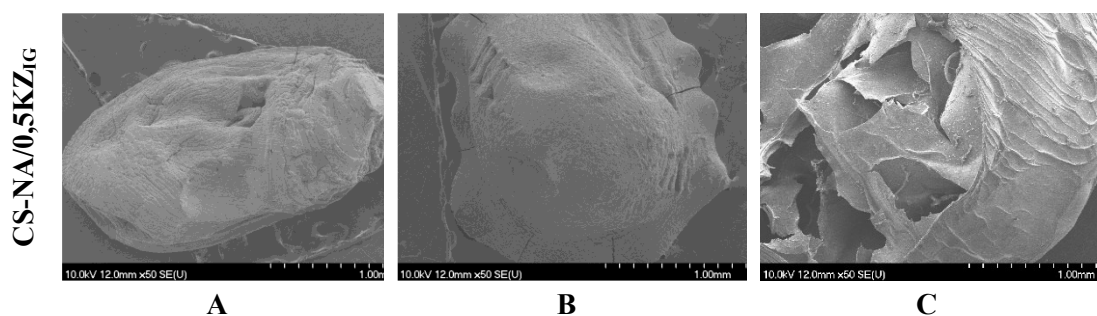
Slika 4.6 SEM slike CS-NA-MDh_{IG} inkapsulata (**A**) sušenih na zraku, (**B**) sušenih pod vakuumom i (**C**) sušenih zamrzavanjem; sa povećanjem 200x i 3000x

Općenito, sušenje na zraku često rezultira neujednačenim sušenjem čestice, što može dovesti do stvaranja pukotina, deformacija ili varijacija u veličini i obliku čestica. Navedene promjene u strukturi ili geometrijskim parametrima mogu ograničiti daljnju primjenu inkapsulata posebice kad se zahtjeva visoka ujednačenost inkapsulata. Hidrogelovi pokazuju sklonost

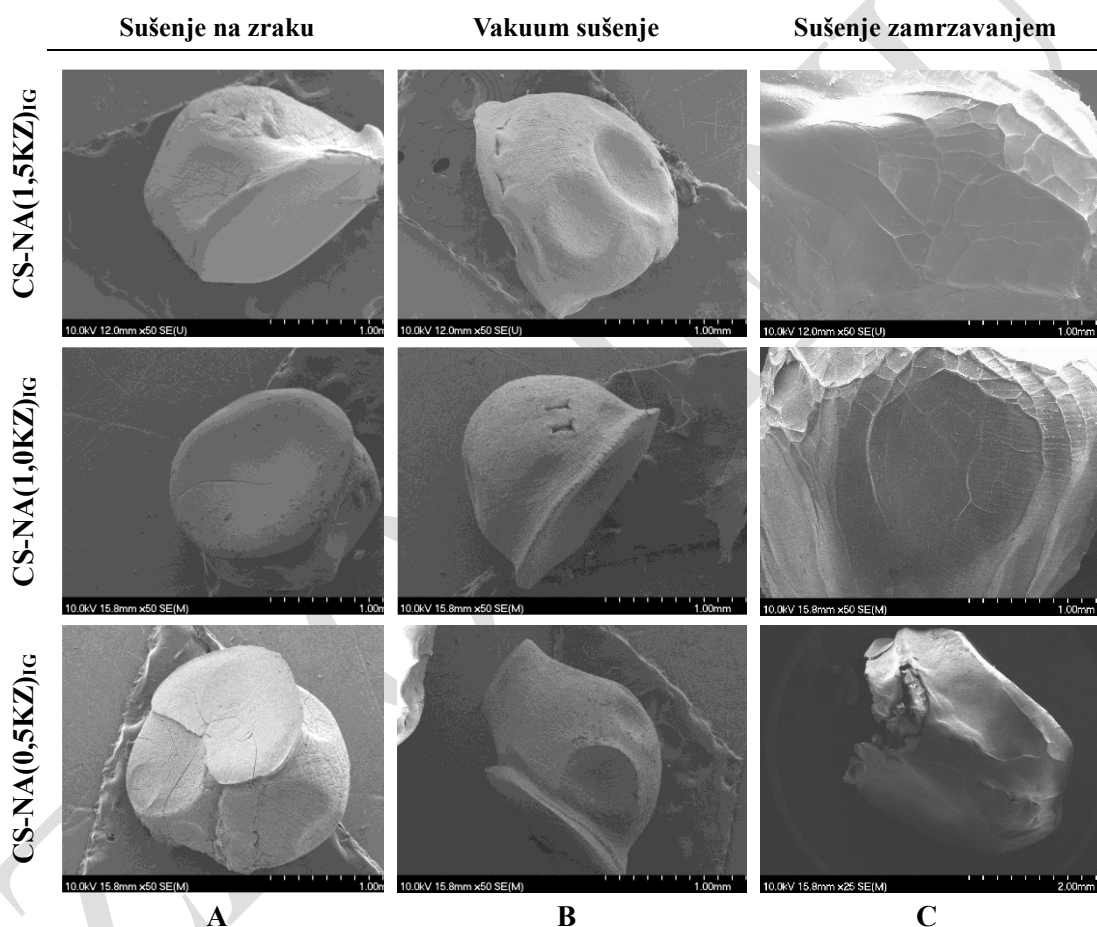
skupljanju i deformacijama tijekom sušenja na zraku, budući da voda postupno isparava, počevši od vanjskih slojeva prema unutra (Xing i sur., 2012). SEM analiza suhih inkapsulata dobivenih pomoću NA i KZ (otopljenog u otopini za umrežavanje odnosno u CaCl_2) pokazala je da inkapsulati dobiveni sušenjem hidrogelova na zraku i pod vakuumom imaju deformiranu strukturu, posebice NA/1,5KZ_{IG} inkapsulati dobiveni sušenjem hidrogelova na zraku. Nadalje uočen je i elipsoidni oblik inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova na zraku (NA/1,0KZ_{IG} i NA/0,5KZ inkapsulati) te inkapsulata dobivenih vakuum sušenjem hidrogelova (NA/1,5KZ_{IG} i NA/1,0KZ_{IG} inkapsulati) (**Slike 4.7 A i B**). Isto tako uočeno je da su inkapsulati dobiveni nakon sušenja hidrogelova na zraku i pod vakuumom jasno vidljivi na SEM slikama pri istom povećanju i ljestvici veličine, dok inkapsulati sušeni zamrzavanjem nisu (**Slika 4.7 C**). Ova opažanja potvrđuju uočene razlike u parametrima veličine, odnosno površine i opsega između suhih inkapsulata dobivenih različitim metodama sušenja hidrogelova (**Tablice 4.7 i 4.8**). Sličan utjecaj metode sušenja na oblik, veličinu i morfologiju je uočen i kod preostalih inkapsulata što se može vidjeti u **Prilogu 1, Slika P1.1**.

Upotrebom NA i KZ koji je korišten metodom naknadnog uranjanja proizvedeni su hidrogelovi koji su nakon sušenja na zraku i pod vakuumom zadržali okrugli oblik (**Slike 4.8 A i B**), ali uočene su pukotine i nabrana površina pri većim povećanjima što je vidljivo na **Slici P1.1**. Inkapsulati dobiveni sušenjem zamrzavanjem, demonstrirali su glatku površinu s minimalnim naborima kako je prikazano na **Slici 4.8 C**.





Slika 4.7 SEM slike CS-NA/KZ_{IG} inkapsulata (KZ otopljen u CaCl₂ u različitim koncentracijama) (A) sušenih na zraku, (B) sušenih pod vakuumom i (C) sušenih zamrzavanjem; sa povećanjem 50x



Slika 4.8 SEM slike CS-NA(KZ)_{IG} inkapsulata (KZ različitih koncentracija korišten metodom naknadnog uranjanja) (A) sušenih na zraku, (B) sušenih pod vakuumom i (C) sušenih zamrzavanjem; sa povećanjem 50x i 25x

Zaključno, rezultati pokazuju značajan utjecaj načina primjene KZ u kombinaciji s NA na morfologiju i geometrijske karakteristike suhih inkapsulata. Inkapsulati dobiveni sušenjem zamrzavanjem imali su bolje očuvane geometrijske parametre i morfologiju, u usporedbi s inkapsulatima dobivenim sušenjem hidrogelova na zraku i vakuum sušenjem, što se pripisuje sporom sublimiranju vode iz zamrznutih čestica tijekom sušenja zamrzavanjem (Balanč i sur.,

2016; Sang i sur, 2023). Unatoč zadržavanju osnovnog obrisa i kontura, na površini inkapsulata osušenih zamrzavanjem mogu pojaviti određene površinske nesavršenosti, kao što su udubljenja (Xing i sur., 2012), što je vidljivo na SEM slikama prikazanim na **Slici P1.1**. Unatoč tome, očuvanje izvorne strukture omogućuje ovim inkapsulatima sušenim zamrzavanjem da vjerno oponašaju karakteristike hidrogelova.

4.4.2.3. Tekstura inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova

Tvrdoća kao odabrani parametar teksture je određena za hidrogelove i za sušene inkapsulate, a dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 4.14**. Rezultati ukazuju na to da su različiti omotači i metode sušenja hidrogelova imali utjecaj na tvrdoću inkapsulata.

Tablica 4.14 Tvrdoća CS hidrogelova dobivenih ionskim geliranjem primjenom različitih omotača i suhih CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova

Omotač	Hidrogelovi ^C	Inkapsulati		
		Sušenje na zraku ^A	Sušenje pod vakuumom ^B	Sušenje zamrzavanjem ^C
		Tvrdoća (N)		
NA _{IG}	0,40 ± 0,07 ^{abc}	31,53 ± 2,01 ^{ab}	30,76 ± 4,55 ^{ab}	3,40 ± 3,52 ^a
NA-MD _{IG}	0,31 ± 0,09 ^{de}	33,35 ± 6,72 ^{ab}	17,54 ± 3,10 ^d	2,02 ± 1,36 ^{ab}
NA-MDh _{IG}	0,44 ± 0,16 ^a	35,03 ± 4,35 ^{ab}	27,90 ± 4,97 ^{abc}	0,93 ± 0,49 ^b
NA-GT _{IG}	0,35 ± 0,09 ^{bcd}	31,78 ± 6,61 ^{ab}	20,61 ± 5,74 ^d	0,78 ± 0,29 ^b
NA-GA _{IG}	0,32 ± 0,03 ^{cde}	28,58 ± 4,85 ^b	28,00 ± 4,02 ^{abc}	1,22 ± 0,43 ^b
NA-ŽEL _{IG}	0,39 ± 0,10 ^{abcd}	33,99 ± 4,28 ^{ab}	17,88 ± 4,52 ^d	0,98 ± 0,66 ^b
NA/1,5KZ _{IG}	0,36 ± 0,07 ^{abcde}	37,91 ± 3,51 ^a	17,72 ± 7,31 ^d	0,49 ± 0,17 ^b
NA/1,0KZ _{IG}	0,30 ± 0,06 ^e	28,12 ± 10,61 ^b	10,83 ± 4,04 ^e	0,46 ± 0,28 ^b
NA/0,5KZ _{IG}	0,39 ± 0,08 ^{abcd}	27,50 ± 8,17 ^b	10,27 ± 6,00 ^e	0,48 ± 0,35 ^b
NA(1,5KZ) _{IG}	0,29 ± 0,07 ^e	38,51 ± 0,99 ^a	22,71 ± 3,45 ^{cd}	0,38 ± 0,10 ^b
NA(1,0KZ) _{IG}	0,34 ± 0,08 ^{bcd}	35,40 ± 9,05 ^{ab}	24,37 ± 6,37 ^{bcd}	1,06 ± 0,75 ^b
NA(0,5KZ) _{IG}	0,41 ± 0,06 ^{ab}	34,64 ± 6,38 ^{ab}	32,88 ± 5,32 ^a	0,71 ± 0,18 ^b

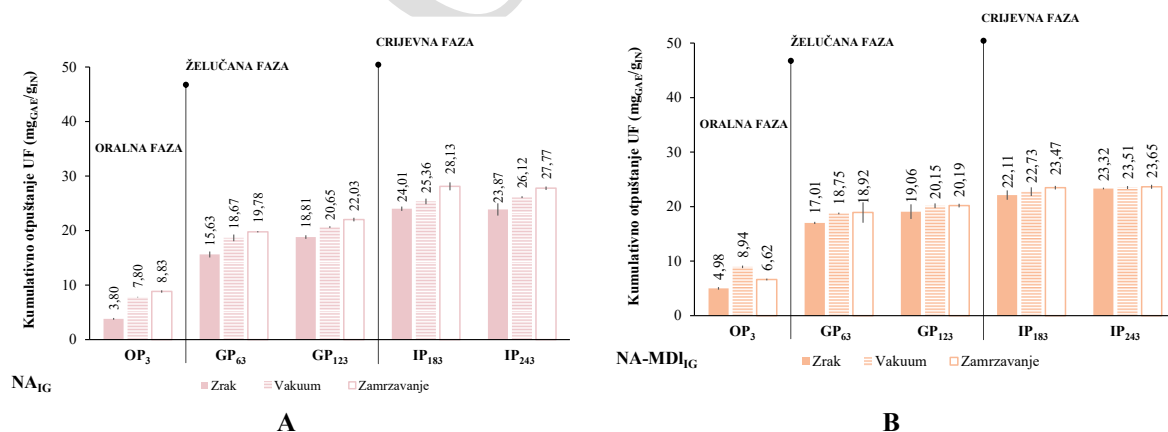
Različita mala slova u istom stupcu (a, b, c, ...) predstavljaju značajne razlike između korištenih omotača, dok velika slova u eksponentu (A, B, C) predstavljaju značajne razlike između hidrogelova i suhih inkapsulata bez obzira na korišteni omotač(e) (ANOVA jednosmjerni test i Duncanov test, $p < 0,05$)

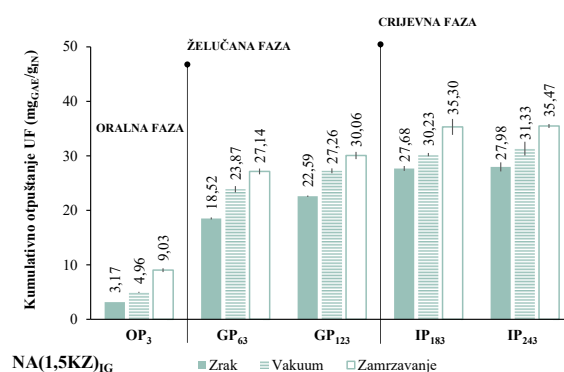
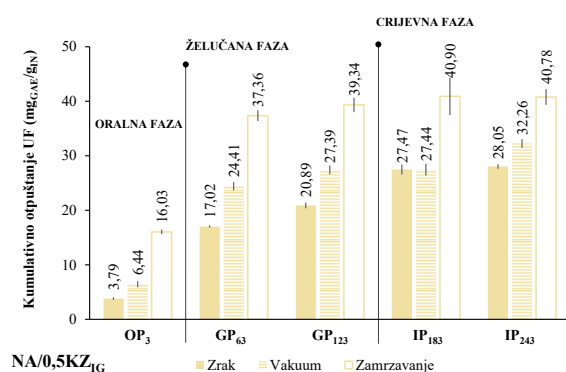
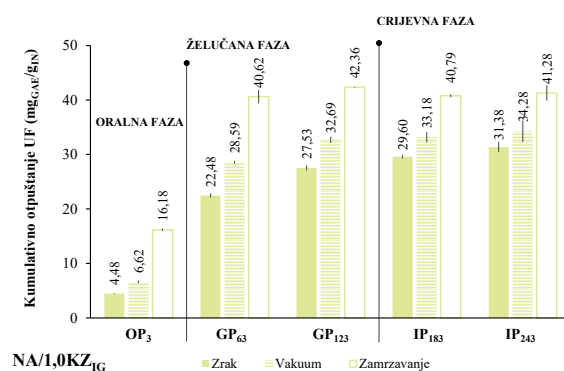
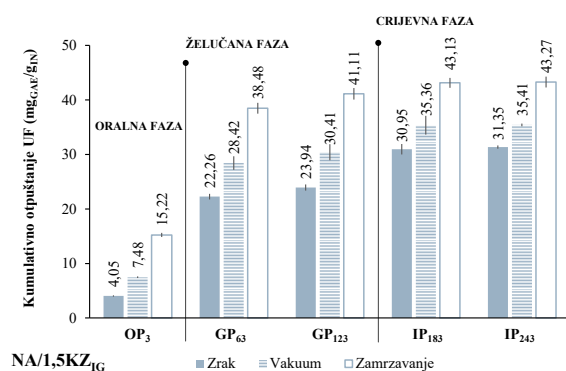
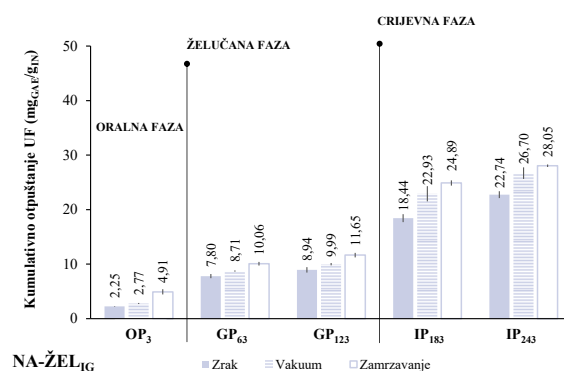
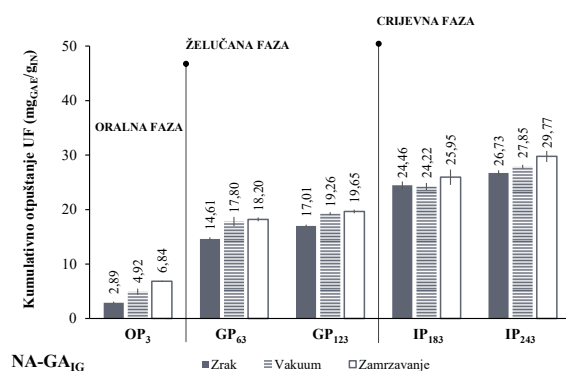
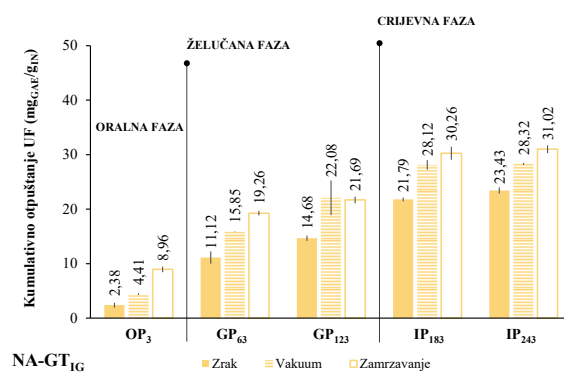
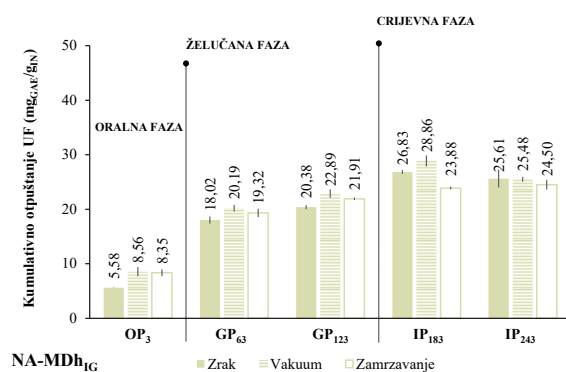
U ovom radu, za hidrogelove NA-MDh_{IG} izmjerena je najveća tvrdoća (0,44 N) no nije uočena značajna statistička (ANOVA i Duncanov test, $p < 0,05$) razlika u tvrdoći za NA-MDh_{IG} u odnosu na NA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA/1,5KZ_{IG}, NA/0,5KZ_{IG} i NA(0,5KZ)_{IG} hidrogelove. Bušić i sur. (2018) su u svojem istraživanju inkapsulacije fenolnih spojeva maslačka pokazali da se tvrdoća hidrogelova povećavala u slučaju primjene kombinacije NA s dodatnim omotačima (izolati proteina, sirutke, kakao praha ili rogača) u odnosu na čiste alginatne hidrogelove.

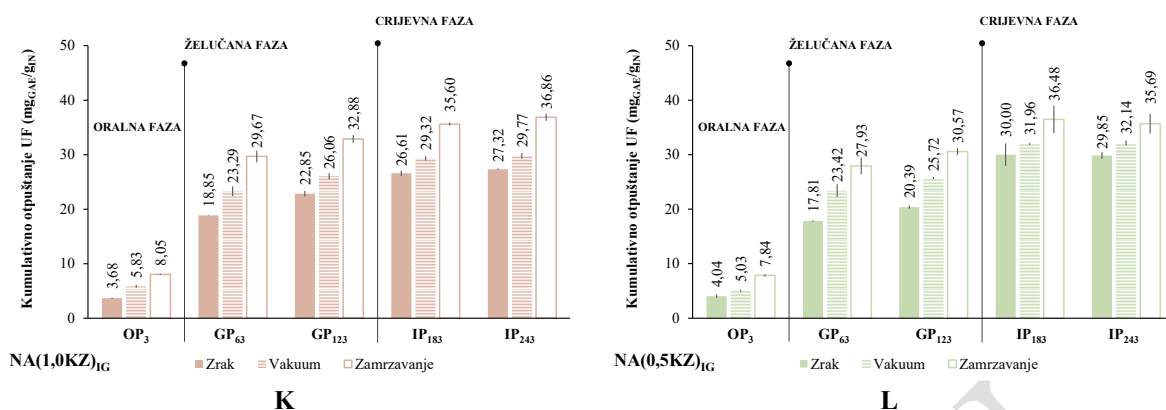
Nadalje, u pogledu utjecaja metode sušenja hidrogelova na tvrdoću suhih inkapsulata uočeno je da je sušenje na zraku i pod vakuumom imalo značajni utjecaj nego sušenje zamrzavanjem na povećanje tvrdoće inkapsulata u odnosu na hidrogelove (**Tablica 4.14**). Tako su, bez obzira na korišteni omotač, inkapsulati dobiveni na zraku imali najveću tvrdoću (28,58 – 38,51 N), a potom ih slijede inkapsulati dobiveni vakuum sušenjem (17,54 – 32,88 N) te na kraju inkapsulati dobiveni liofilizacijom (0,38 – 3,40 N). Hidrogelovi imaju sposobnost zadržavanja znatnih količina tekućine zbog svoje hidrofilnosti (Lin i Metters, 2006). Stoga, povećanje tvrdoće može biti povezano s procesom uklanjanja vode tijekom sušenja, što rezultira kompaktnijom strukturom osušenih inkapsulata. Ta kompaktna struktura zahtijeva veću silu za kompresiju, što ukazuje na povećanje tvrdoće suhih inkapsulata.

4.4.2.4. *In vitro* otpuštanje fenolnih spojeva iz suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem - utjecaj omotača i metode sušenja hidrogelova

Profil kumulativnog otpuštanja UF-a iz CS inkapsulata dobivenih sušenjem hidrogelova na zraku, pod vakuumom i zamrzavanjem, pripremljenih s 12 različitih omotača, određen je tijekom tri faze probave, odnosno OP, GP, i IP faze simulirane *in vitro* probave bez probavnih enzima (**Slika 4.9**). Cilj je bio utvrditi najpoželjniji trend otpuštanja fenolnih spojeva s obzirom na korištene omotače i metodu sušenja hidrogelova te odabrati one za daljinu pripremu inkapsulata kod kojih će otpuštanje biti najveće u IP fazi kao potencijalnom mjestu apsorpcije fenolnih spojeva.







Slika 4.9 Kumulativno otpuštanje UF-a iz CS inkapsulata (IN u indeksu mjerne jedinice) dobivenih ionskim geliranjem (IG u indeksu) pomoću različitih omotača te sušenjem hidrogelova na zraku, pod vakuumom i zamrzavanjem. OP-oralna faza, GP-želučana faza, IP-crijevna faza (broj u indeksu – trajanje *in vitro* simulirane probave bez enzima)

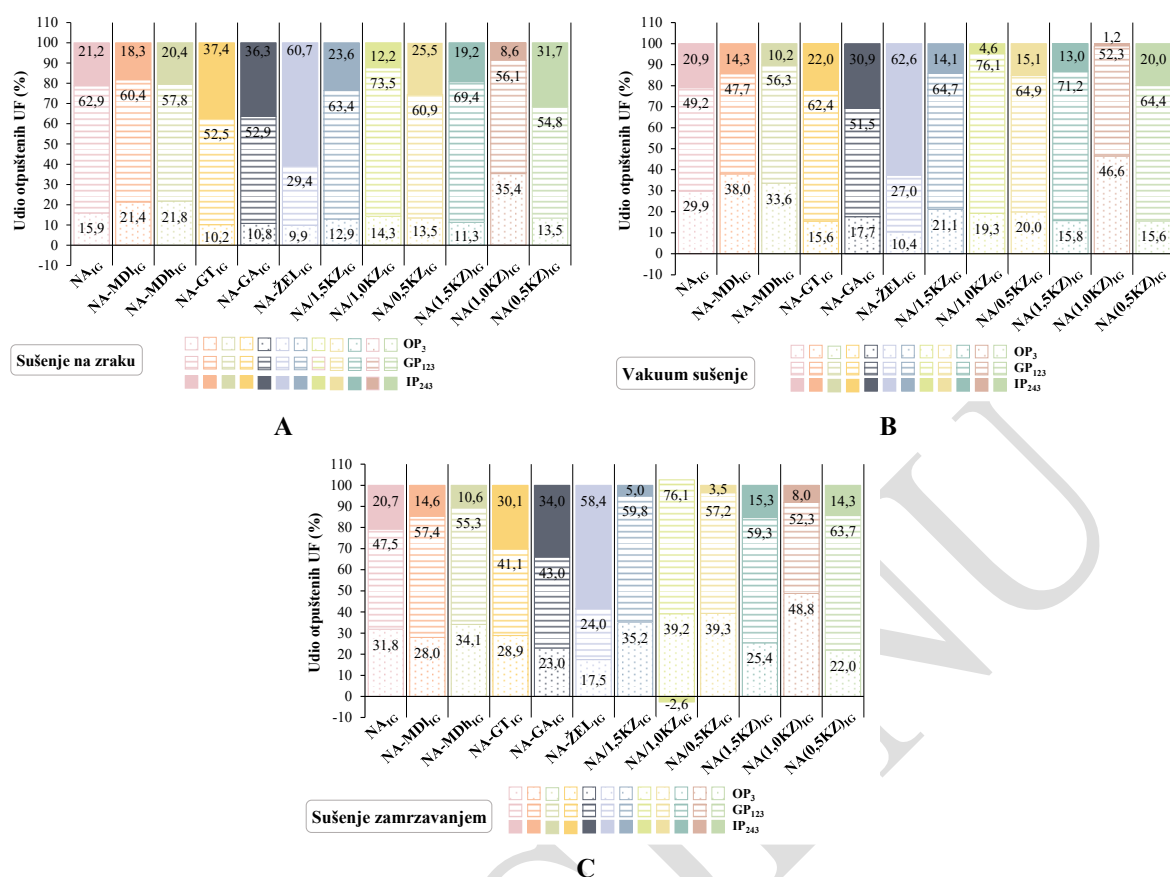
Općenito, unatoč različitim metodama sušenja, primijećen je sličan trend povećanja otpuštanja UF-a iz suhih inkapsulata tijekom tri faze probave odnosno od OP do IP. Međutim, najveće kumulativno otpuštanje UF-a u IP zabilježeno je iz inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem (23,65 – 43,27 mg_{GAE}/g_{IN}), potom onih dobivenih vakuum sušenjem (23,51 – 35,41 mg_{GAE}/g_{IN}), dok je kod inkapsulata sušenih na zraku uočen najmanji maseni udio otpuštenih UF-a otpuštanje UF (22,74 – 31,38 mg_{GAE}/g_{IN}).

Sušenje zamrzavanjem je široko korištena metoda za očuvanje fenolnih spojeva nakon ionskog geliranja jer struktura inkapsulata ostaje očuvana, a uklanjanjem ledenih kristala tijekom procesa sušenja stvaraju se udubljenja koja povećavaju površinu i time potiču bržu difuziju fenolnih spojeva u okolnu otopinu. Abdin i sur. (2021) dobili su slične rezultate, s većim otpuštanjem UF-a iz inkapsulata sušenih zamrzavanjem u usporedbi s onima sušenim pod vakuumom. Sušenjem hidrogelova na zraku, inkapsulirani fenolni spojevi izloženi su promjenjivim okolnim uvjetima, primjerice vlazi, svjetlu i promjenama temperature, što može dovesti do njihove razgradnje i posljedično do nestabilnog i nepredvidljivog profila otpuštanja (Slika 4.9). Inkapsulati sušeni na zraku bili su najmanji (Tablice 4.7 – 4.10) i imali su najveću tvrdoću (Tablica 4.14). Njihova gusta struktura ometa prodiranje probavnih tekućina, što utječe na slabije otpuštanje fenolnih spojeva, slično rezultatima koje su objavili (Guzman-Villanueva i sur., 2013). Osim toga, inkapsulati sušeni na zraku pokazali su najmanje odstupanje od sferičnog oblika (Tablica 4.11 i 4.12, Slika P1.1), što ukazuje da je kontaktna površina s probavnim tekućinama manja i rezultira nižom koncentracijom otpuštenih UF-a. Sušenje pod vakuumom je nježnije od sušenja na zraku i ima povoljan učinak na stabilnost fenolnih spojeva (Parikh, 2015), a prednost u odnosu na sušenje na zraku je kontrolirano sušenje, što rezultira

proizvodom ujednačenije kvalitete. U usporedbi s inkapsulatima sušenim na zraku, inkapsulati sušeni pod vakuumom imali su nešto veće parametre veličine (**Tablice 4.7 – 4.10**), veće odstupanje od oblika kruga (**Tablica 4.11 i 4.12**) i manju tvrdoću (**Tablica 4.14**) te sličan profil otpuštanja, ali generalno gledajući s nešto većim udjelom otpuštenih UF-a (**Slika 4.9**).

Uočeno je da različite vrste omotača imaju različite učinke na otpuštanje fenolnih spojeva, pri čemu je najviši kumulativni udio UF-a u IP određen u slučaju korištenja KZ_{IG} otopljenog u CaCl₂ (40,78 – 43,27 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 G – I**). Slijede KZ_{IG} inkapsulati, kada se KZ_{IG} koristio za uranjanje hidrogelova (35,47 – 36,86 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 J – L**), zatim NA-GT_{IG} (31,02 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 D**), NA-GA_{IG} (29,77 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 E**), NA-ŽEL_{IG} (28,05 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 F**), NA_{IG} (27,77 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 A**), NA-MDh_{IG} (24,50 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 C**) i NA-MDl_{IG} (23,65 mg_{GAE/gIN}) (**Slika 4.9 B**). Rezultati ukazuju na to da su inkapsulati pripremljeni s NA_{IG}, koji je najčešće korišten kao omotač za inkapsulaciju bioaktivnih tvari, pokazali niži kumulativni udio otpuštenih UF-a u IP-u u usporedbi s većinom ispitivanih omotača gdje je NA kombiniran s drugim omotačima, osim kada je kombiniran s maltodekstrinima. Prema istraživanju drugih autora (Bušić i sur., 2018; Essifi i sur., 2021). dokazano je da NA inkapsulati imaju poroznu strukturu te da nisu dovoljno stabilni u kiselom mediju želuca gdje vlada niski pH te zbog toga brže otpuštaju inkapsulirane tvari. Ovaj fenomen opravdava primjenu dodatnog omotača s ciljem poboljšanja kontroliranog otpuštanja fenolnih spojeva i omogućavanja njihove „dostave“ u IP.

Udio otpuštenih UF-a u svakoj od tri faze probave od ukupno otpuštenih UF-a za ispitane omotače prikazan je na **Slici 4.10 A – C**. Ovi podaci predstavljaju postotak otpuštanja UF-a u svakoj fazi probave u odnosu na ukupni postotak otpuštenih UF tijekom 243-minutnog *in vitro* otpuštanja. Najpoželjniji profil otpuštanja UF-a vidljiv je kod NA-ŽEL_{IG} inkapsulata kod koji je ujedno i otpušten najveći udio UF-a (58,4 – 62,6 %) tijekom IP, dok je manji udio otpuštenih UF-a uočen tijekom GP (24,0 – 29,4 %) i OP (9,9 – 17,5 %) (**Slika 4.10 A – C**), bez obzira na korištenu metodu sušenja (**Slika 4.9 F**). To bi moglo biti povezano s činjenicom da ovi inkapsulati bolje nabubre pri pH vrijednostima koje se nalaze u IP fazi, što omogućava manju difuziju UF-a u GP i veću u IP, što su i dokazali drugi autori (Devi i Kakati, 2013).



Slika 4.10 Udio otpuštenih UF-a iz CS inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača za svaku gastrointestinalnu fazu: OP-oralnu fazu, GP-želučanu fazu, IP-crijevnu fazu za inkapsulate sušene na zraku (A), pod vakuumom (B) i zamrzavanjem (C)

Osim toga, sličan postotak UF-a u IP se otpustio iz NA-GT_{IG} (22,0 – 37,4 %) i NA-GA_{IG} inkapsulata (30,9 – 36,3 %). Njihovo bolje otpuštanje UF-a u usporedbi s NA_{IG} inkapsulatima pri crijevnom pH može se pripisati elektrostatičkoj odbojnosti između negativno nabijenih karboksilnih skupina u natrijevom alginatu, gumama arabici i tragacanth, što potiče bolje bubrenje inkapsulata i bolje otpuštanje (Nayak i Pal, 2011; Apoorva i sur., 2020). Tsai i sur. (2017) inkapsulirali su sok od nusproizvoda rotkvice te su također primijetili povećano otpuštanje fenolnih spojeva u IP iz NA-GA inkapsulata u usporedbi s NA inkapsulatima. Slično tome, Apoorva i sur. (2020) uočili su povećanje otpuštanja fenolnih spojeva iz NA-GT inkapsulata koji su sadržavali ekstrakt špinata roda *Basella*.

U slučaju primjene KZ_{IG} kao omotača, najmanje poželjna dinamika otpuštanja UF-a bez obzira na metodu sušenja uočena je kod NA/1,0KZ_{IG} i NA(1,0KZ)_{IG} inkapsulata (**Slika 4.10 A – C**). **Slika 4.10 C** čak prikazuje negativan postotak otpuštanja UF-a u IP za NA(1,0KZ)_{IG} inkapsulate (–2,6 %). S druge strane, s obzirom na to da je metoda sušenja zamrzavanjem pokazala najbolju učinkovitost u pogledu otpuštanja UF-a za sve inkapsulate dobivene

kombinacijom NA_{IG} i KZ_{IG} (**Slika 4.9 G – L**), može se zaključiti da je među svim ispitanim inkapsulatima pripremljenim s KZ_{IG} , najviši postotak UF-a otpušten u IP-u iz $NA(1,5KZ)_{IG}$ inkapsulata (15,3 %) (**Slika 4.10 C**). Sličan zaključak postignut je i u istraživanju (Dai i sur., 2008) kada su proučavali učinke ove dvije metode dodavanja kitozana na otpuštanje nifedipina. Primijetili su bolji profil otpuštanja nifedipina iz inkapsulata uronjenih u otopinu KZ (0,1 % (w/v)) nego kada je KZ otopljen u otopini $CaCl_2$ što pripisuju stvaranju različite jačine veza između karboksilnih skupina NA i amino skupina KZ u ovisnosti o načinu dodavanja KZ i pH. Naime pri nižim vrijednostima pH kakve vladaju u GP fazi probave te veze bile su izraženije kada su alginatni hidrogelovi gelovi uranjeni u otopinu KZ, a povećanjem pH (u IP fazi probave) dolazilo je do slabljenja tih veza što pospješuje bubrenje i bolje otpuštanje aktivne tvari. Kada se KZ dodaje u otopinu za umrežavanje i postaje dio mreže hidrogela, može se povezivati s fenolnim spojevima putem vodikovih veza i elektrostatičkih interakcija (Siripatrawan i Vitchayakitti, 2016). Međutim, budući da distribucija KZ u hidrogelovima tijekom ionskog geliranja nije jednolika i može dovesti do varijacija u brzini otpuštanja, potrebno bi bilo napraviti optimizaciju procesa inkapsulacije s tim omotačem kako bi se postigao željeni profil otpuštanja. S druge strane, ako se hidrogelovi urone u otopinu kitozana, primarna interakcija između KZ i hidrogelova događa se na površini, rezultirajući nižom koncentracijom KZ u unutrašnjosti hidrogelova (Kurozawa i Hubinger, 2017). Ovime je omogućeno produženo otpuštanje fenolnih spojeva iz unutrašnjosti inkapsulata i obično se događa sporije zbog ograničenog prodiranja kitozana u dublje slojeve hidrogela (Deladino i sur., 2008; Anbinder i sur., 2011). Belščak-Cvtanović i sur. (2015a, 2015b) također su primijetili slične rezultate, gdje je upotreba kitozana kao dodatnog omotača produžila otpuštanje fenolnih spojeva iz alginatnih inkapsulata koji su sadržavali ekstrakt zelenog čaja.

Postotak otpuštanja u IP za $NA-MD_{IG}$ inkapsulate (14,3 – 18,3 %) i $NA-MDh_{IG}$ (10,2 – 20,4 %) bio je niži nego kod NA_{IG} inkapsulata (20,7 – 21,2 %), bez obzira na metodu sušenja (**Slika 4.10 A – C**). Može se pretpostaviti da zbog većeg postotka otpuštanja UF-a u OP iz $NA-MD_{IG}$ (21,4 – 38,0 % za $NA-MD_{IG}$ i 21,8 – 34,1 % za $NA-MDh_{IG}$) u usporedbi s NA_{IG} inkapsulatima (15,9 – 31,8 %), dolazi do smanjenja kumulativnog udjela otpuštenih UF-a u IP-u (**Slika 4.9 B i C**). Iako rezultati ukazuju na sličan profil otpuštanja UF-a za oba testirana maltodekstrina, općenito MDh sadrži više reducirajućih šećernih grupa, čime se ubrzava otpuštanje fenolnih spojeva. MDh je skloniji stvaranju stabilnih kompleksa s fenolnim spojevima, ali formirani hidrogelovi se brže razgrađuju, što rezultira bržim otpuštanjem. Maltodekstrini pokazuju

izvrsnu kemijsku stabilnost u širokom rasponu pH vrijednosti, čineći ih prikladnim omotačima za različite prehrambene i farmaceutske primjene (Antigo i sur., 2017).

4.4.2.5. Opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz suhih inkapsulata matematičkim modelima

Kinetika otpuštanja fenolnih spojeva u ovom radu opisana je matematičkim modelima (model prvog reda, Hixson-Crowell model, Higuchi model i Korsmeyer-Peppas model) opisanim u **Tablici 3.13** pomoću kojih je na osnovi određenih parametara modela moguće teoretski predvidjeti proces otpuštanja fenolnih spojeva u ovisnosti o različitim procesnim parametrima (vrsti omotača, te veličini i obliku inkapsulata). Nadalje, iz parametara modela, moguće je odrediti fizikalne parametre procesa, primjerice koeficijent difuzije aktivne tvari, te procijeniti mehanizam prijenosa tvari (Siepmann i Peppas, 2012). Parametri modela korištenih za opisivanje kinetike otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz suhih CS inkapsulata i statistički kriteriji za uspješnost aproksimacije eksperimentalnih podataka primijenjenim modelima prikazani su u **Tablicama 4.15 – 4.17**, dok je grafički prikaz kinetike otpuštanja fenolnih tvari iz inkapsulata i aproksimacije podataka ispitanim matematičkim modelima dan na **Slici P1.2**.

Tablica 4.15 Procijenjeni **parametri** primijenjenih **matematičkih modela** za opisivanje kinetike **otpuštanja UF-a** (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} – konstante otpuštanja za odgovarajući model; n – eksponent difuzije) iz **CS inkapsulata** pripremljenih ionskim geliranjem pomoću **različitih omotača** (NA_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-MDh_{IG}, NA-GT_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA/1,5KZ_{IG}, NA/1,0KZ_{IG}, NA/0,5KZ_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG} i NA(0,5KZ)_{IG}) i **sušenjem na zraku** te statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela (R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije, AIC – Akaike informacijski kriterij, MSC – kriterij odabira modela)

Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modelom													
Matematički modeli		NA _{IG}	NA-MD _{IG}	NA-MDh _{IG}	NA-GT _{IG}	NA-GA _{IG}	NA-ŽEL _{IG}	NA/1,5KZ _{IG}	NA/1,0KZ _{IG}	NA/0,5KZ _{IG}	NA(1,5KZ) _{IG}	NA(1,0KZ) _{IG}	NA(0,5KZ) _{IG}
Model prvog reda	R^2_{adj}	0,883	0,800	0,870	0,937	0,940	0,871	0,927	0,956	0,938	0,947	0,907	0,847
	AIC	122,424	128,485	107,839	98,383	96,895	103,793	94,204	94,455	98,334	96,720	118,643	117,176
	MSC	1,715	1,063	1,520	2,410	2,430	1,710	2,182	2,710	2,373	2,508	1,950	1,465
	k_I	0,026	0,028	0,025	0,013	0,013	0,007	0,027	0,027	0,019	0,020	0,027	0,020
Higuchi model	R^2_{adj}	0,907	0,763	0,873	0,968	0,974	0,908	0,899	0,917	0,958	0,937	0,902	0,928
	AIC	118,302	131,282	107,161	88,532	85,018	98,944	98,604	103,672	92,865	99,141	119,538	105,822
	MSC	1,972	0,888	1,569	3,113	3,279	2,057	1,844	2,052	2,764	2,335	1,894	2,222
	k_H	7,653	7,827	7,842	6,711	6,825	5,427	7,838	7,808	7,381	7,542	7,658	7,166
Hixson-Crowell model	R^2_{adj}	0,817	0,677	0,804	0,934	0,922	0,849	0,898	0,935	0,915	0,907	0,850	0,796
	AIC	129,606	136,257	113,583	98,956	100,576	106,792	98,660	100,124	102,820	104,678	126,461	121,472
	MSC	1,266	0,577	1,110	2,369	2,167	1,496	1,840	2,305	2,053	1,940	1,461	1,179
	k_{HC}	0,006	0,006	0,006	0,003	0,003	0,002	0,006	0,006	0,004	0,006	0,006	0,004
Korsmeyer-Peppas model	R^2_{adj}	0,966	0,962	0,960	0,964	0,974	0,876	0,922	0,941	0,968	0,942	0,960	0,965
	AIC	102,097	102,421	91,966	91,102	85,689	103,236	96,046	99,682	90,163	98,842	106,177	95,709
	MSC	2,985	2,692	2,654	2,930	3,231	1,750	2,041	2,337	2,957	2,357	2,729	2,896
	k_{KP}	14,352	21,398	18,014	7,183	7,844	7,090	11,255	11,083	10,125	10,819	15,653	12,528
	n	0,376	0,296	0,331	0,485	0,474	0,427	0,431	0,431	0,441	0,430	0,347	0,387

Podebljano su označeni statistički kriteriji modela koji najbolje opisuje otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz pojedinih inkapsulata

Tablica 4.16 Procijenjeni **parametri** primijenjenih **matematičkih modela** za opisivanje kinetike **otpuštanja UF-a** (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} – konstante otpuštanja za odgovarajući model; n – eksponent difuzije) iz **CS inkapsulata** pripremljenih ionskim geliranjem pomoću **različitih omotača** (NA_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-MDh_{IG}, NA-GT_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA/1,5KZ_{IG}, NA/1,0KZ_{IG}, NA/0,5KZ_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG} i NA(0,5KZ)_{IG}) i **sušenjem pod vakuumom** te statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela (R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije, AIC – Akaike informacijski kriterij, MSC – kriterij odabira modela)

Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modelom

Matematički modeli		NA _{IG}	NA-MD _{IG}	NA-MDh _{IG}	NA-GT _{IG}	NA-GA _{IG}	NA-ŽEL _{IG}	NA/1,5KZ _{IG}	NA/1,0KZ _{IG}	NA/0,5KZ _{IG}	NA(1,5KZ) _{IG}	NA(1,0KZ) _{IG}	NA(0,5KZ) _{IG}
Model prvog reda	R^2_{adj}	0,763	0,484	0,758	0,917	0,773	0,842	0,890	0,935	0,886	0,929	0,850	0,872
	AIC	130,454	139,840	117,124	101,960	112,607	106,774	98,038	99,289	104,500	98,197	125,003	115,313
	MSC	0,835	-0,188	0,765	2,098	0,930	1,524	1,652	2,213	1,641	2,201	1,341	1,555
	k_I	0,031	0,033	0,034	0,018	0,021	0,008	0,031	0,037	0,029	0,031	0,032	0,034
Higuchi model	R^2_{adj}	0,711	0,318	0,689	0,957	0,844	0,881	0,789	0,765	0,804	0,835	0,736	0,799
	AIC	133,679	144,465	120,617	92,484	107,248	102,842	106,585	117,610	112,391	110,983	133,959	122,174
	MSC	0,634	-0,477	0,515	2,775	1,313	1,805	0,994	0,905	1,078	1,288	0,781	1,098
	k_H	7,923	8,151	8,791	7,351	7,328	5,334	8,197	8,385	7,741	7,756	8,066	8,002
Hixson-Crowell model	R^2_{adj}	0,602	0,160	0,592	0,900	0,685	0,797	0,788	0,783	0,802	0,819	0,690	0,737
	AIC	138,772	147,805	124,416	104,783	117,235	109,872	106,659	116,226	112,471	112,257	136,602	126,209
	MSC	0,316	-0,686	0,244	1,897	0,599	1,303	0,989	1,004	1,072	1,197	0,616	0,829
	k_{HC}	0,006	0,007	0,007	0,004	0,005	0,002	0,006	0,007	0,006	0,006	0,007	0,007
Korsmeyer-Peppas model	R^2_{adj}	0,972	0,970	0,932	0,963	0,966	0,807	0,921	0,874	0,938	0,912	0,941	0,921
	AIC	96,881	95,217	100,254	90,256	86,519	110,462	94,296	109,328	97,289	100,753	110,458	108,911
	MSC	2,934	2,601	1,970	2,934	2,793	1,261	1,940	1,496	2,156	2,018	2,250	1,982
	k_{KP}	25,980	37,973	30,488	11,610	18,227	8,719	19,079	19,439	17,917	16,029	20,859	17,139
	n	0,257	0,183	0,238	0,403	0,315	0,401	0,335	0,327	0,335	0,361	0,311	0,354

Podebljano su označeni statistički kriteriji modela koji najbolje opisuje otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz pojedinih inkapsulata

Tablica 4.17 Procijenjeni **parametri** primijenjenih **matematičkih modela** za opisivanje kinetike **otpuštanja UF-a** (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} – konstante otpuštanja za odgovarajući model; n – eksponent difuzije) iz **CS inkapsulata** pripremljenih ionskim geliranjem pomoću **različitih omotača** (NA_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-MD_{hIG}, NA-GT_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA/1,5KZ_{IG}, NA/1,0KZ_{IG}, NA/0,5KZ_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG} i NA(0,5KZ)_{IG}) i **sušenjem zamrzavanjem** te statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela (R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije, AIC – Akaike informacijski kriterij, MSC – kriterij odabira modela)

Matematički modeli		Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modelom											
		NA _{IG}	NA-MD _{IG}	NA-MD _{hIG}	NA-GT _{IG}	NA-GA _{IG}	NA-ŽEL _{IG}	NA/1,5KZ _{IG}	NA/1,0KZ _{IG}	NA/0,5KZ _{IG}	NA(1,5KZ) _{IG}	NA(1,0KZ) _{IG}	NA(0,5KZ) _{IG}
Model prvog reda	R^2_{adj}	0,692	0,807	0,750	0,706	0,690	0,815	0,814	0,766	0,755	0,831	0,815	0,885
	AIC	133,945	127,955	113,562	114,978	114,796	108,980	102,280	113,591	111,694	109,170	127,310	113,833
	MSC	0,548	1,049	0,651	0,630	0,590	1,313	0,971	0,723	0,753	1,155	1,094	1,642
	k_I	0,029	0,034	0,031	0,020	0,018	0,009	0,045	0,053	0,054	0,028	0,031	0,034
Higuchi model	R^2_{adj}	0,680	0,719	0,648	0,822	0,836	0,895	0,523	0,392	0,412	0,763	0,693	0,787
	AIC	134,613	133,906	118,352	107,915	105,891	101,097	115,299	128,302	126,689	113,980	135,406	123,137
	MSC	0,506	0,677	0,309	1,134	1,226	1,876	-0,030	-0,328	-0,318	0,811	0,588	1,022
	k_H	7,905	8,076	8,022	7,195	6,874	5,819	8,575	8,891	8,651	7,742	8,043	8,200
Hixson-Crowell model	R^2_{adj}	0,538	0,628	0,582	0,617	0,609	0,765	0,426	0,375	0,324	0,721	0,642	0,740
	AIC	140,504	138,453	120,751	118,689	118,069	112,351	117,618	128,650	128,593	116,260	137,914	126,132
	MSC	0,138	0,393	0,137	0,365	0,356	1,072	-0,208	-0,353	-0,454	0,649	0,431	0,822
	k_{HC}	0,006	0,007	0,007	0,005	0,004	0,003	0,007	0,007	0,007	0,006	0,006	0,007
Korsmeyer-Peppas model	R^2_{adj}	0,973	0,973	0,984	0,969	0,966	0,808	0,898	0,916	0,952	0,973	0,951	0,946
	AIC	95,693	96,633	75,559	83,834	84,535	110,410	94,252	101,249	91,717	84,141	106,900	103,034
	MSC	2,939	3,007	3,365	2,854	2,751	1,211	1,589	1,604	2,116	2,943	2,370	2,362
	k_{KP}	28,240	25,306	29,726	22,868	20,290	11,670	31,031	37,419	35,335	22,548	22,941	20,035
	n	0,236	0,268	0,234	0,261	0,275	0,338	0,250	0,207	0,210	0,288	0,291	0,325

Podebljano su označeni statistički kriteriji modela koji najbolje opisuje otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz pojedinih inkapsulata

Pri usporedbi modela koji imaju različit broj parametara pouzdaniji statistički kriterij za procjenu uspješnosti aproksimacije podataka modelom je prilagođeni koeficijent determinacije (R^2_{adj}) u odnosu na koeficijent determinacije (R^2). R^2 se u pravilu povećava (ili ostaje isti) s povećanjem broja parametara modela pri čemu dodatni parametri modela ne moraju pozitivno doprinositi aproksimaciji podataka odabranim modelom što može upućivati na pogrešan zaključak (problem poznat kao „precjenjivanje modela“). S druge strane R^2_{adj} će rasti samo ako povećanje broja parametara modela pozitivno doprinosi aproksimaciji podataka modelom. Stoga je model s najvećim R^2_{adj} vrijednostima smatran najprikladnijim za opisivanje eksperimentalnih podataka (Costa i Sousa Lobo, 2001a). S druge strane, ukoliko se uspoređuju dva ili više modela, model s nižom AIC vrijednosti smatra se prikladnijim za opisivanje promatranog procesa. Ovaj kriterij se često primjenjuje za učinkovit način utvrđivanja modela koji najpreciznije opisuje otpuštanje neke aktivne tvari. MSC je također statistički kriterij koji se često primjenjuje prilikom odabira prikladnog modela za opisivanje procesa *in vitro* otpuštanja, a s obzirom da je to modificirani recipročni oblik AIC vrijednosti smatra se da je model s većom MSC vrijednosti prikladniji za opisivanje procesa otpuštanja aktivne tvari.

Ukoliko se promatraju CS inkapsulati dobiveni različitim metodama sušenja, prema statističkim kriterijima R^2_{adj} i AIC, model prvog reda bio je najprikladniji za aproksimaciju kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata dobivenih sušenjem na zraku odnosno iz NA/1,5KZ_{IG} ($R^2_{adj} = 0,927$; AIC = 94,204; $k_l = 0,027$), NA/1,0KZ_{IG} ($R^2_{adj} = 0,956$; AIC = 94,455; $k_l = 0,027$) i NA(1,5KZ)_{IG} ($R^2_{adj} = 0,947$; AIC = 96,720; $k_l = 0,020$) (**Tablica 4.15, Slika P1.2**) te iz NA/1,0KZ_{IG} ($R^2_{adj} = 0,935$; AIC = 99,289; $k_l = 0,037$) i NA(1,5KZ)_{IG} ($R^2_{adj} = 0,929$; AIC = 98,197, $k_l = 0,031$) inkapsulata dobivenih vakuum sušenjem (**Tablica 4.16, Slika P1.2**) dok se ovaj model nije pokazao prikladan za opisivanje otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata pripremljenih sušenjem zamrzavanjem (**Tablica 4.17**). Model prvog reda opisuje sustav koji bubri, a bioaktivna tvar difundira kroz nabubreni sustav (Unagolla i Jayasuriya, 2018). Parametar modela koji karakterizira kinetiku otpuštanja bioaktivne komponente je konstanta otpuštanja modela prvog reda (k_l). Vrijednost k_l daje informaciju o brzini otpuštanja, gdje viša vrijednost ukazuje na brže otpuštanje, dok niža vrijednost sugerira sporiju brzinu otpuštanja. Povećanje parametra k_l za navedene omotače odgovaralo je povećanju otpuštanja UF-a u GP (**Slika 4.10 A i B**). Nakon OP faze, inkapsulati bubre i na njihovoj površini sloj gela djeluje kao barijera i usporava prodor probavnih tekućina i oslobađanje fenolnih spojeva. O korištenom omotaču ovisi debljina sloja gela na površini, a što je deblji sloj gela na površini inkapsulata smanjeno je otpuštanje fenolnih spojeva tijekom vremena zbog veće duljine

difuzijskog puta ciljane tvari što rezultira kinetikom otpuštanja aktivnih tvari prema modelu prvog reda.

Slično modelu prvog reda, Higuchi model također se temelji na principu difuzije aktivne tvari. Iako se teoretski ne može primijeniti za analizu sustava koji bubri, zbog svoje jednostavnosti često se primjenjuje u polimernim sustavima koji imaju svojstvo bubrenja (Unagolla i Jayasuriya, 2018). Higuchi model pokazao se najprikladniji za otpuštanje UF iz NA-ŽEL_{IG} inkapsulata ($R^2_{adj} = 0,881 - 0,908$; $AIC = 98,944 - 102,842$; $k_I = 5,334 - 5,427$) bez obzira na primijenjenu metodu sušenja te iz NA-GT_{IG} ($R^2_{adj} = 0,968$; $AIC = 88,532$; $k_I = 6,711$) i NA-GA_{IG} inkapsulata ($R^2_{adj} = 0,974$; $AIC = 85,018$; $k_I = 6,825$) sušenih na zraku (**Tablice 4.15 – 4.17, Slika P1.2**). Ovaj model razvijen je za opisivanje otpuštanja aktivne tvari iz različitih poroznih sustava, posebno za otpuštanje slabo topivih tvari inkapsuliranih u polučvrste ili čvrste sustave. Prema ovom modelu, oslobađanje aktivnih tvari se povećava sa smanjenjem zakrivljenosti u mreži hidrogela (Arianto i sur., 2015). Pretpostavlja se da dolazi do snažnih ionskih interakcija polimera koje se koriste u procesu inkapsulacije, što dovodi do povećane zakrivljenosti mreže hidrogelova. Ovo objašnjava manje otpuštanje UF-a u OP i GP. Kasnije, kako inkapsulati nabubre, dolazi do smanjenja spomenute zakrivljenosti, što potencijalno potiče intenzivnije otpuštanje UF-a u IP (**Slika 4.10 A – C**).

Hixson-Crowell model nije se pokazao prikladnim za opisivanje otpuštanja UF-a iz ispitivanih inkapsulata.

Korsmeyer-Peppas model je matematički model koji se često koristi za opisivanje kinetike otpuštanja aktivnih spojeva iz polimernih sustava, a prilagođava se za sustave s nepravilnim oblicima čestica i nehomogenim svojstvima materijala (Paarakh i sur., 2018; Malekjani i Jafari, 2021). Ovaj model pokazao se najprikladniji za otpuštanje UF-a iz NA_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-MDh_{IG}, NA/0,5KZ_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG} i NA(0,5KZ)_{IG} inkapsulata, bez obzira na primijenjenu metodu sušenja (**Tablice 4.15 – 4.17, Slika P1.2**), te za otpuštanje UF-a iz NA-GT_{IG}, NA-GA_{IG} i NA/1,5KZ_{IG} inkapsulata sušenih pod vakuumom (**Tablica 4.16**). Parametar Korsmeyer-Peppas modela, k_{KP} daje informacije o ionskoj jakosti okolne otopine u kojoj se nalaze inkapsulati. Što je manja vrijednost k_{KP} , veća je ionska jakost u vanjskom okruženju, što može utjecati na otpuštanje aktivnih spojeva utječući na strukturu inkapsulata i vezu omotača s fenolnim spojevima. Općenito, veća ionska jakost, odnosno, niža vrijednost k_{KP} , upućuje na veću vjerojatnost zadržavanja inkapsuliranih tvari unutar sustava i sporijeg otpuštanja tih tvari. S druge strane, veće vrijednosti k_{KP} ili manja ionska jakost ukazuju na brže otpuštanje aktivnih spojeva (Wu i sur., 2019). Upravo je to dokazano i u ovom radu, za NA/1,0KZ_{IG} inkapsulate

koji su dobiveni sušenjem zamrzavanjem, a imali su najveću vrijednost k_{KP} ($k_{KP} = 37,419$) (**Tablica 4.17**) i najveće otpuštanje UF-a u OP i GP fazi zajedno (**Slika 4.10 C**). Međutim, ipak su moguća i odstupanja od navedenih tvrdnji što potvrđuju rezultati za otpuštanje UF-a iz NA-MDl_{IG} inkapsulata gdje su najveće vrijednost k_{HP} utvrđene za inkapsulate sušenih na zraku ($k_{KP} = 21,398$) i pod vakuumom ($k_{KP} = 37,973$) (**Tablica 4.15 i 4.17**), dok je najveće otpuštanje UF-a u oralnoj i zatim želučanoj fazi opaženo kod NA(1,0KZ)_{IG} inkapsulata sušenih na zraku i pod vakuumom (**Slika 4.10 A i B**). Navedeno upućuje na kompleksnost strukture inkapsulata i potrebu sveobuhvatnijeg promatranja procesa otpuštanja uključujući više relevantnih faktora (EE_{IG} , geometrijske parametre, teksturu, morfologiju), a ne samo parametar k promatranog modela. Drugi parametar Korsmeyer-Peppas modela je parametar n kojeg određuje morfologija sustava, u ovom slučaju inkapsulata, a koristi se za karakterizaciju mehanizma otpuštanja aktivnih spojeva (Malekjani i Jafari, 2021). Vrijednost ovog parametra tijekom otpuštanja UF-a iz inkapsulata sušenih na zraku iznosila je od 0,296 do 0,441 (**Tablica 4.15**) zatim iz inkapsulata sušenih pod vakuumom u rasponu od 0,183 do 0,403 (**Tablica 4.16**) te iz inkapsulata sušenih zamrzavanjem od 0,207 do 0,325 (**Tablica 4.17**). Ukoliko je vrijednost parametra n niža od 0,43 radi se o česticama koje su sferičnog oblika, a iz njih se aktivna tvar otpušta prema Fickovom zakonu difuzije što je slučaj i za navedene inkapsulate za čije se otpuštanje pokazao najprikladniji Korsmeyer-Peppas model.

Rezultati istraživanja opisanih u **poglavlju 4.4.2** pokazali su da izbor omotača za inkapsulaciju i metoda sušenja značajno utječu na EE , geometrijske parametre, teksturu i morfologiju inkapsulata. Dodatak drugog omotača natrijevom alginatu povećao je EE_{IG} za 1,2 – 2,0 puta te površinu hidrogelova za 1,1 – 1,6 puta u odnosu na primjenu samog alginata. Primjenom metode oblaganja kitozonom postignuta je najviša EE (73,88 %) korištenjem 1,0 % (w/v) kitozana (NA/1,0 KZ_{IG}), dok su hidrogelovi pripremljeni istom metodom uz 1,5 % (w/v) kitozana (NA/1,5 KZ_{IG}) imali najveću površinu (19,32 mm²).

Metoda sušenja značajno je utjecala na fizikalna svojstva inkapsulata. Liofilizacija je uzrokovala najmanje promjene morfologije i najmanje smanjenje parametara veličine s obzirom na hidrogelove (31 – 62 % manja površina; 8,2 – 35,0 % manji opseg; 11,7 – 32,4 % manja duljina i 19,6 – 41,1 % manja širina inkapsulata. Analiza parametara oblika (kružnost, zaobljenost i ujednačenost površine) hidrogelova i uzoraka osušenih na zraku, u vakuum sušioniku i liofilizacijom pokazala je određene oscilacije u pojedinim parametrima, pri čemu su u nekim slučajevima zabilježena povećanja, a u drugim smanjenja vrijednosti. S obzirom na

to da primijećenim promjenama ne odgovara jednoznačan trend, navedena odstupanja mogu se pripisati osjetljivosti analize slike.

Nadalje omotači i metoda sušenja značajno su utjecali i na otpuštanje fenolnih spojeva iako je primijećen sličan trend povećanja otpuštanja UF-a od OP do IP. Najmanje kumulativno otpuštanje UF-a u IP zabilježeno je kod inkapsulata sušenih na zraku (22,74 – 31,38 mg_{GAE}/g_{IN}), zatim kod uzoraka sušenih pod vakuumom (23,51 – 35,41 mg_{GAE}/g_{IN}), dok je najveće kumulativno otpuštanje UF-a uočeno kod inkapsulata sušenih zamrzavanjem (23,65 – 43,27 mg_{GAE}/g_{IN}). Inkapsulati NA-ŽEL_{IG} pokazali su najpoželjniji profil otpuštanja UF-a, pri čemu je najveći udio otpušten u IP (58,4 – 62,6 %) neovisno o primijenjenoj metodi sušenja.

Također, s obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da se otpuštanje UF-a iz svih ispitanih inkapsulata odvijalo prema Fickovom zakonu difuzije. Korsmeyer-Peppas model se pokazao najprikladniji za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz najviše inkapsulata (NA_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-MDh_{IG}, NA/0,5KZ_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG}, NA(0,5KZ)_{IG} bez obzira na primijenjenu metodu sušenja. Ovaj model posebno se pokazao dominantnim u slučaju opisivanja kinetike otpuštanja fenolnih spojeva iz svih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem osim za inkapsulate NA-ŽEL_{IG} za koje se najprikladniji pokazao Higuchi model.

4.4.3. Karakterizacija različitih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem – utjecaj omotača i ekstrakta

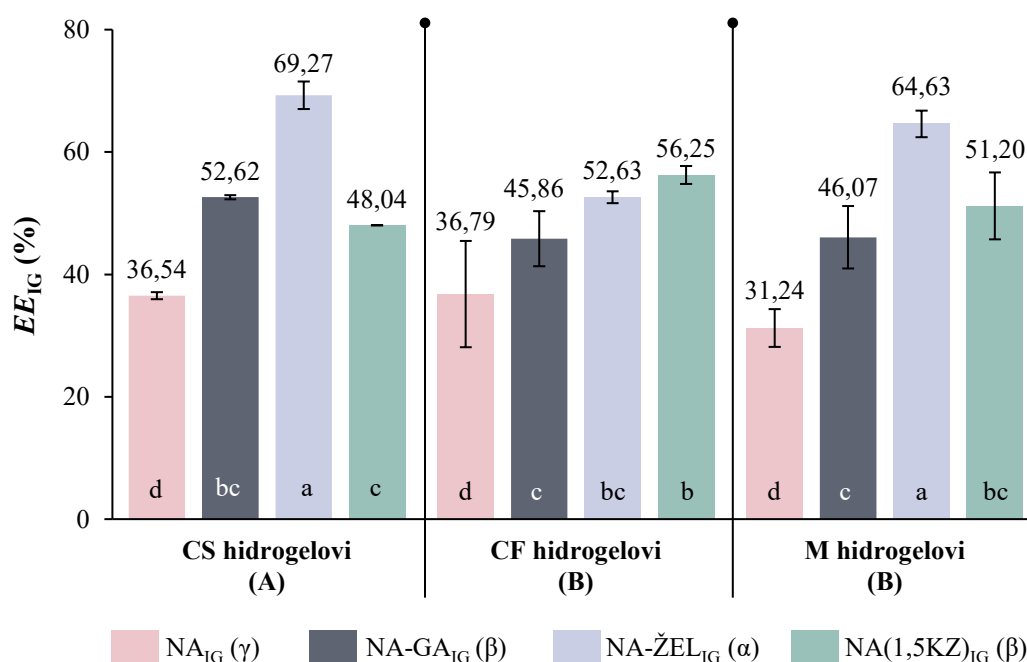
Za potrebe svih daljnjih istraživanja, inkapsulacija ionskim geliranjem provedena je pomoću prethodno navedenih odabranih omotača kako za CS ekstrakte tako i za dodatna dva ekstrakta tropa grožđa (CF i M) dok je sušenje zamrzavanjem korišteno za pripremu suhih inkapsulata iz hidrogelova.

Zbog bolje preglednosti i lakše usporedbe rezultata vezanih za utjecaj omotača i ekstrakta na fizikalno-kemijska i strukturna i funkcionalna svojstva inkapsulata (veličina, oblik, morfologija, tekstura, EE_{IG} , *in vitro* otpuštanja fenolnih spojeva bez prisustva enzima u probavnim otopinama), usporedno su prikazani rezultati za sva tri ispitivana ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M). Također, svi odabrani omotači, ekstrakti tropa grožđa i suhi inkapsulati analizirani su tehnikama rendgenske difrakcije praha (XRPD) i diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) kako bi se ispitala njihova kristaličnost, odnosno amorfnost.

4.4.3.1. Učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva ionskim geliranjem za različite inkapsulate - utjecaj omotača i ekstrakta

EE_{IG} ekstrakata tropa grožđa (CS, CF, M) bogatih fenolnim spojevima pomoću odabranih omotača (NA_{IG} , $NA-GA_{IG}$, $NA-ŽEL_{IG}$ i $NA(1,5KZ)_{IG}$) prikazana je na **Slici 4.11**. Korištenjem omotača NA_{IG} postignuta je EE_{IG} u rasponu od 31,24 % do 36,79 % za ispitivane uzorke ekstrakata tropa grožđa. Također, kod svih ispitivanih ekstrakata tropa grožđa uočeno je da korištenjem dodatnog omotača uz NA_{IG} dolazi do povećanja EE_{IG} . Tako je primjenom omotača $NA-GA_{IG}$ postignuta EE_{IG} od 45,86 % do 52,62 %, $NA-ŽEL_{IG}$ od 52,63 % do 69,27 % i $NA(1,5KZ)_{IG}$ od 48,04 % do 56,25 %.

Statistička analiza utjecaja ekstrakta i omotača na EE_{IG} provedena je faktorskim ANOVA ($p < 0,05$) testom (**Tablica 4.18**).



Slika 4.11 Učinkovitost inkapsulacije ionskim geliranjem (EE_{IG} , %) ekstrakata tropa grožđa bogatih fenolnim spojevima (CS, CF i M hidrogelovi) korištenjem različitih omotača (NA_{IG} , $NA-GA_{IG}$, $NA-ŽEL_{IG}$, $NA(1,5KZ)_{IG}$). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$.

Tablica 4.18 Faktorski ANOVA test za EE_{IG} - značajnost utjecaja omotača (NA_{IG} , $NA-GA_{IG}$, $NA-ŽEL_{IG}$, $NA(1,5KZ)_{IG}$) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije ionskim geliranjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Ekstrakt	100,85	2	50,42	3,47	0,0474 *	2,3 %
Omotač	3438,07	3	1146,02	78,90	0,0000 *	76,8 %
Ekstrakt × omotač	591,94	6	98,66	6,79	0,0003 *	13,2 %
Pogreška	348,59	24	14,52			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Prema faktorskom ANOVA testu oba faktora (ekstrakt i omotač) su imali značajan utjecaj na EE_{IG} te postoji statistički značajna interakcija između njih (Slika 4.11 i Tablica 4.18). Pri tome je 76,8 % varijance svih podataka posljedica varijabilnosti faktora „omotač“, pri čemu je najveći utjecaj na EE_{IG} imao omotač NA-ŽEL, dok je samo 2,3 % varijance bila posljedica varijabilnosti faktora „ekstrakt“ uz najveće marginalne srednje vrijednosti EE_{IG} kod inkapsuliranih CS ekstrakata dok nije bilo statistički značajne razlike u EE_{IG} kod CS i M uzoraka. Interakcija omotača i ekstrakta utjecala je na varijabilnost podataka sa 13,7 % varijance. Za pretpostaviti je da je povećanje EE_{IG} u slučaju dodatnih omotača posljedica svojstava korištenih omotača. Primjerice, KZ, zbog svoje kationske prirode, formira membranu oko hidrogela polianionskog alginata stvaranjem veza između karboksilnih skupina anionskog alginata i protoniranih amino skupina kitozana (Stoica i sur., 2013). Zbog ovih veza, manje fenolnih spojeva se gubi tijekom inkapsulacije, a proizvedeni hidrogelovi su čvršći. Dodavanje omotača kao što je guma arabika smanjuje poroznost natrij alginatnih hidrogelova, sprječavajući difuziju fenolnih spojeva tijekom ionskog geliranja u okolnu otopinu (Tsai i sur., 2017). Nadalje, proteini sadržani u strukturi gume arabike mogu formirati veze s fenolnim spojevima iz ekstrakata tropa grožđa, što također osigurava bolju EE . Poznato je da proteini u interakciji s fenolnim spojevima stvaraju hidrofobne i vodikove veze, ali se također mogu vezati i s slobodnim karboksilnim skupinama polimera. Ovakve interakcije proteina s fenolnim spojevima objašnjavaju i povećanje EE kada je za inkapsulaciju korišten dodatni proteinski omotač odnosno želatina u odnosu na čisti natrij alginat (Li i sur., 2009; Jyothi i sur., 2010).

4.4.3.2. Geometrijski parametri, tekstura i morfologija različitih suhih inkapsulata - utjecaj omotača i ekstrakta

Ispitan je utjecaj korištenih omotača za inkapsulaciju i ekstrakata na geometrijske parametre odnosno parametre veličine (površina, opseg, maksimalni i minimalni Feret) i parametre oblika

(kružnost, zaobljenost i ujednačenost površine) te na teksturu (tvrdoću) (Tablice 4.19 i 4.20) i morfologiju različitih inkapsulata tropa grožđa (Slika 4.12).

Tablica 4.19 Parametri veličine (površina, opseg, Feret), oblika (kružnost, zaobljenost, ujednačenost površine) i texture (tvrdoća) CS, CF i M inkapsulata pripremljenih ionskim geliranjem pomoću NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG} i NA-ŽEL_{IG} i sušenjem zamrzavanjem

Parametar	Suhi inkapsulati		Vrijednost parametra		
Parametri veličine					
Površina (mm ²)	omotač / ekstrakt		CS ^B	CF ^A	M ^C
	NA _{IG}	δ	4,50 ± 1,15 ^g	6,62 ± 1,72 ^e	5,42 ± 1,38 ^f
	NA-GA _{IG}	β	10,12 ± 0,78 ^b	9,14 ± 1,02 ^c	7,51 ± 0,86 ^d
	NA-ŽEL _{IG}	α	10,26 ± 0,80 ^b	11,18 ± 0,96 ^a	10,69 ± 0,98 ^{ab}
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	8,16 ± 1,47 ^d	7,63 ± 2,71 ^d	5,46 ± 1,69 ^f
Opseg (mm)	omotač / ekstrakt		CS ^A	CF ^A	M ^B
	NA _{IG}	δ	8,57 ± 0,84 ^f	10,24 ± 1,26 ^d	9,42 ± 1,39 ^e
	NA-GA _{IG}	β	13,46 ± 1,08 ^a	12,13 ± 0,61 ^b	11,09 ± 0,67 ^c
	NA-ŽEL _{IG}	α	13,45 ± 0,72 ^a	13,79 ± 0,86 ^a	13,90 ± 1,09 ^a
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	11,63 ± 1,14 ^{bc}	11,37 ± 2,37 ^c	9,53 ± 1,50 ^e
Feret _{MAX} (mm)	omotač / ekstrakt		CS ^B	CF ^A	M ^A
	NA _{IG}	δ	2,84 ± 0,26 ^e	3,39 ± 0,38 ^c	3,00 ± 0,34 ^{dc}
	NA-GA _{IG}	β	4,12 ± 0,28 ^a	3,77 ± 0,19 ^b	3,45 ± 0,20 ^c
	NA-ŽEL _{IG}	α	4,11 ± 0,33 ^a	4,24 ± 0,27 ^a	4,17 ± 0,24 ^a
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	3,70 ± 0,33 ^b	3,51 ± 0,64 ^c	3,12 ± 0,42 ^d
Feret _{MIN} (mm)	omotač / ekstrakt		CS ^C	CF ^B	M ^A
	NA _{IG}	δ	2,17 ± 0,30 ^g	2,68 ± 0,36 ^e	2,46 ± 0,38 ^f
	NA-GA _{IG}	β	3,34 ± 0,22 ^{bc}	3,20 ± 0,20 ^c	2,94 ± 0,17 ^d
	NA-ŽEL _{IG}	α	3,38 ± 0,19 ^{ab}	3,53 ± 0,18 ^a	3,46 ± 0,19 ^{ab}
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	2,99 ± 0,29 ^d	2,90 ± 0,49 ^d	2,43 ± 0,40 ^f
Parametri oblika					
Kružnost (-)	omotač / ekstrakt		CS ^B	CF ^A	M ^{AB}
	NA _{IG}	α	0,76 ± 0,07 ^{abcd}	0,79 ± 0,06 ^a	0,76 ± 0,07 ^{abc}
	NA-GA _{IG}	β	0,71 ± 0,08 ^{ef}	0,78 ± 0,05 ^{ab}	0,77 ± 0,04 ^{abc}
	NA-ŽEL _{IG}	γ	0,72 ± 0,06 ^{ef}	0,74 ± 0,07 ^{bcde}	0,70 ± 0,07 ^f
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,76 ± 0,06 ^{abcd}	0,72 ± 0,07 ^{def}	0,74 ± 0,07 ^{cde}
Zaobljenost (-)	omotač / ekstrakt		CS ^B	CF ^A	M ^{AB}
	NA _{IG}	γ	0,79 ± 0,09 ^d	0,80 ± 0,08 ^{bcd}	0,85 ± 0,08 ^a
	NA-GA _{IG}	α	0,83 ± 0,09 ^{abcd}	0,87 ± 0,06 ^a	0,87 ± 0,06 ^a
	NA-ŽEL _{IG}	αβ	0,85 ± 0,08 ^a	0,86 ± 0,08 ^a	0,84 ± 0,06 ^{ab}
	NA(1,5KZ) _{IG}	βγ	0,83 ± 0,07 ^{abc}	0,86 ± 0,06 ^a	0,80 ± 0,07 ^{cd}
Ujednačenost površine (-)	omotač / ekstrakt		CS ^A	CF ^A	M ^B
	NA _{IG}	β	0,94 ± 0,03 ^{cd}	0,96 ± 0,02 ^{ab}	0,95 ± 0,02 ^{bc}
	NA-GA _{IG}	α	0,96 ± 0,01 ^{ab}	0,97 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,01 ^a
	NA-ŽEL _{IG}	α	0,96 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,01 ^{ab}
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,96 ± 0,01 ^{ab}	0,94 ± 0,02 ^{cd}	0,94 ± 0,03 ^d
Parametar teksture					
Tvrdoća (N)	omotač / ekstrakt		CS ^A	CF ^B	M ^B
	NA _{IG}	α	3,40 ± 3,52 ^a	1,36 ± 0,66 ^b	0,97 ± 0,30 ^b
	NA-GA _{IG}	β	1,22 ± 0,43 ^b	0,63 ± 0,15 ^b	0,56 ± 0,25 ^b
	NA-ŽEL _{IG}	β	0,98 ± 0,66 ^b	0,49 ± 0,20 ^b	0,41 ± 0,28 ^b
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,38 ± 0,10 ^b	0,56 ± 0,26 ^b	1,13 ± 0,37 ^b

Vrijednosti u istom stupcu označene s različitim abecednim slovima označavaju statistički značajnu razliku između podataka (ANOVA i Duncanov test, $p < 0,05$). Indeks IG odnosi se na metodu inkapsulacije ionskim geliranjem.

Statistička analiza prema faktorskom ANOVA testu (**Tablica 4.20**) pokazuje da je omotač imao najveći utjecaj na sve parametre veličine i oblika te teksturu (7,4 – 58,1 % varijance), dok je ekstrakt imao manji utjecaj na varijabilnost geometrijskih parametara i teksture sa 1,5 – 7,6 % varijance, a interakcija ova dva faktora je utjecala na varijabilnost podataka sa 5,2 – 14,7 %.

Tablica 4.20 Statistička značajnost utjecaja omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) na parametre veličine, oblika i teksture suhih inkapsulata dobivenih inkapsulacijom ionskim geliranjem te sušenjem zamrzavanjem prema faktorskom ANOVA testu te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Parametar	Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Parametri veličine							
Površina	Ekstrakt	120,99	2	60,49	30,97	0,0000 *	5,1 %
	Omotač	1367,73	3	455,91	233,37	0,0000 *	58,1 %
	Ekstrakt × omotač	187,50	6	31,25	16,00	0,0000 *	8,0 %
	Pogreška	679,85	348	1,95			
Opseg	Ekstrakt	58,17	2	29,08	19,56	0,0000 *	3,5 %
	Omotač	919,36	3	306,45	206,09	0,0000 *	55,8 %
	Ekstrakt × omotač	151,29	6	25,22	16,96	0,0000 *	9,2 %
	Pogreška	517,46	348	1,49			
Feret _{MAX}	Ekstrakt	6,03	2	3,02	25,31	0,0000 *	5,1 %
	Omotač	59,08	3	19,69	165,30	0,0000 *	50,3 %
	Ekstrakt × omotač	10,80	6	1,80	15,11	0,0000 *	9,2 %
	Pogreška	41,46	348	0,12			
Feret _{MIN}	Ekstrakt	3,93	2	1,97	21,86	0,0000 *	4,1 %
	Omotač	53,21	3	17,74	197,10	0,0000 *	55,1 %
	Ekstrakt × omotač	8,04	6	1,34	14,89	0,0000 *	8,3 %
	Pogreška	31,32	348	0,09			
Parametri oblika							
Kružnost	Ekstrakt	0,03	2	0,02	4,05	0,0183 *	2,0 %
	Omotač	0,13	3	0,04	10,13	0,0000 *	7,4 %
	Ekstrakt × omotač	0,11	6	0,02	4,19	0,0004 *	6,1 %
	Pogreška	1,50	348	0,00			
Zaobljenost	Ekstrakt	0,03	2	0,02	2,99	0,0517	1,5 %
	Omotač	0,11	3	0,04	6,31	0,0004 *	4,8 %
	Ekstrakt × omotač	0,12	6	0,02	3,40	0,0028 *	5,2 %
	Pogreška	2,00	348	0,01			
Ujedačenost površine	Ekstrakt	0,00	2	0,00	5,41	0,0049 *	2,4 %
	Omotač	0,02	3	0,01	19,38	0,0000 *	12,8 %
	Ekstrakt × omotač	0,01	6	0,00	6,49	0,0000 *	8,5 %
	Pogreška	0,10	348	0,00			
Parametar teksture							
Tvrdća	Ekstrakt	14,21	2	7,11	6,82	0,0016 *	7,6 %
	Omotač	33,23	3	11,08	10,63	0,0000 *	17,7 %
	Ekstrakt × omotač	27,54	6	4,59	4,40	0,0005 *	14,7 %
	Pogreška	112,56	108	1,04			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Geometrijski parametri (veličina i oblik) proizvedenih inkapsulata su fizikalna svojstva koja općenito ovise o metodi inkapsulacije, svojstvima ekstrakta te o korištenom omotaču i metodi stabilizacije hidrogelova kao što je vidljivo i iz rezultata i rasprave u **poglavlju 4.4.2.2.** ovog doktorskog rada. Geometrija inkapsulata jednostavan je fizički fenomen koji utječe na

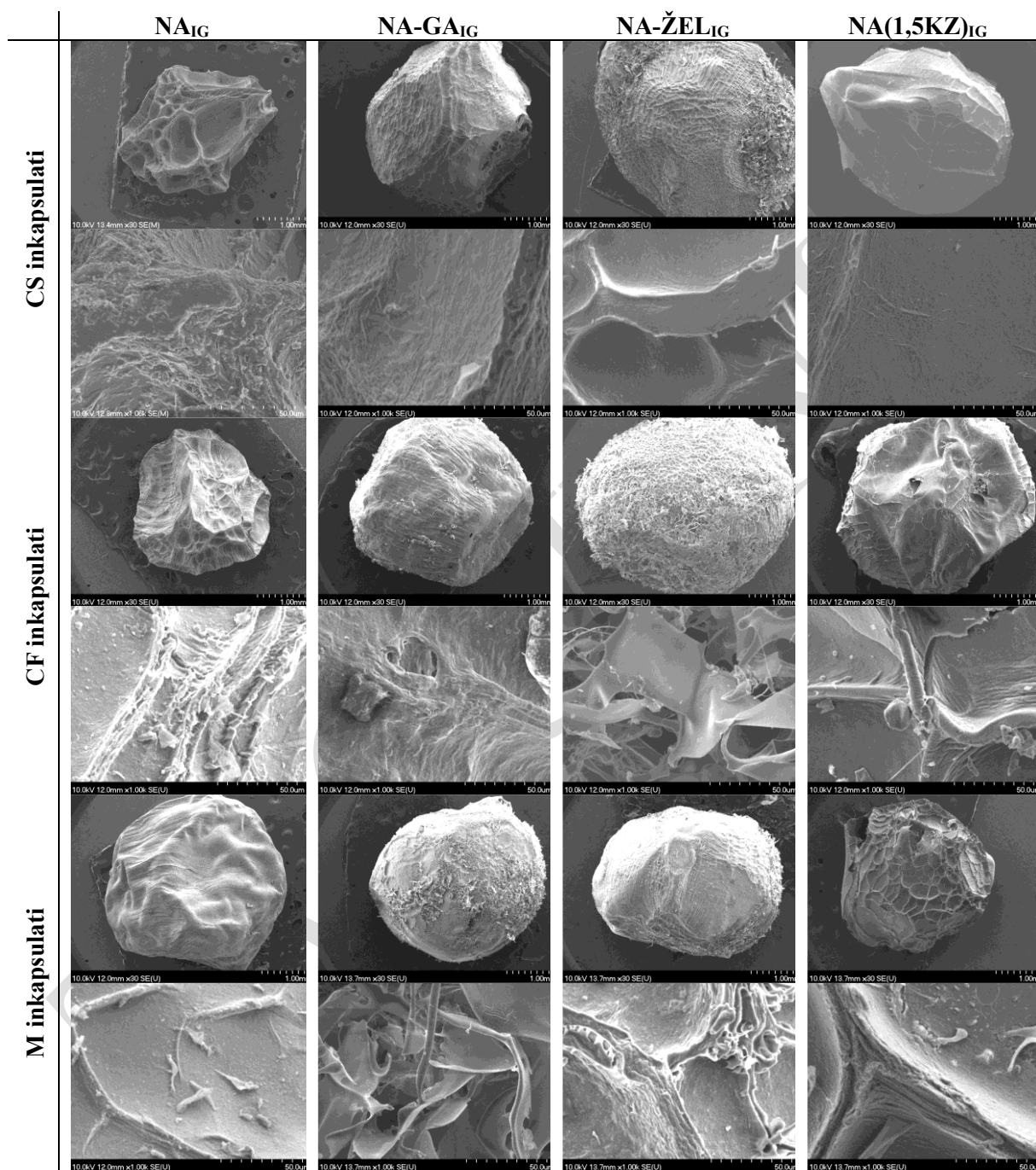
farmakodinamička i farmakokinetička svojstva inkapsulirane tvari. Promjene u geometriji mogu utjecati na interakcije inkapsulata sa stanicama ili proteinima i, općenito, na biodistribuciju u gastrointestinalnom sustavu (Mutalik i sur., 2020). Ovi parametri imaju i značajan utjecaj na oslobađanje aktivnog sastojka iz inkapsulata - u ovom slučaju fenolnih spojeva. Na primjer, proizvedeni inkapsulati s višim *EE* često imaju veću debljinu, što onda uzrokuje sporije otpuštanje, dok inkapsulati koji imaju manju veličinu imaju veću kontaktnu površinu, što može dovesti do bržeg otpuštanja inkapsulirane aktivne tvari (Yun i sur., 2021).

Iz **Tablice 4.19** je vidljivo da su svi NA-ŽEL_{IG} inkapsulati (CS, CF i M) pokazali najveće vrijednosti svih mjerenih parametara veličine (površina, opseg i Feret), dok su za NA_{IG} inkapsulate zabilježene najniže vrijednosti. Ispitivanjem parametara oblika, uočeno je da NA_{IG} inkapsulati imaju najveće vrijednosti kružnosti (0,76 – 0,79), a na NA-ŽEL_{IG} najmanje vrijednosti (0,70 – 0,74) što je mjera odstupanja čestica od sferičnosti. Nasuprot kružnosti, mjerenjem zaobljenosti inkapsulata, koji predstavlja zakrivljenost obrisa čestice, NA_{IG} inkapsulati imali su najmanje vrijednosti (0,79 – 0,85), dok su NA-GA_{IG} inkapsulati imali najveće vrijednosti zaobljenosti (0,83 – 0,87). Ujednačenost površine proučavanih čestica iznosila je u rasponu od 0,94 do 0,97, a u ovom slučaju prema statističkoj analizi nije postojala značajna razlika (Duncanov test, $p < 0,05$) između NA-GA_{IG} i NA-ŽEL te između NA_{IG} i NA-(1,5KZ)_{IG} iako su prva dva spomenuta omotača imala nešto bolju ujednačenost površine u odnosu na posljednja dva omotača.

Rezultati teksture pokazuju da NA_{IG} inkapsulati imaju najveću tvrdoću (0,97 – 3,40 N), dok su tvrdoće NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata bile 0,56 – 1,22 N, 0,41 – 0,98 N te 0,38 – 1,13 N (**Tablica 4.19**). Tvrdoća NA_{IG} inkapsulata bila je statistički značajno različita (Duncanov test, $p < 0,05$) od ostalih inkapsulata bez obzira na inkapsulirani ekstrakt. Poznato je da se iz tvrdog matriksa inkapsulirani sastojak sporije otpušta, ali to nije bio slučaj u ovom radu (kao što je opisano u **poglavlju 4.4.2.4.** zbog utjecaja mnogih drugih čimbenika prethodno opisanih (veličina, oblik i morfologija inkapsulata).

Slike dobivene SEM-om potvrđuju podatke dobivene za parametre veličine inkapsulata, tj. vidi se da su NA_{IG} inkapsulati manji od ostalih (**Slika 4.12**). Može se uočiti da NA-ŽEL_{IG} inkapsulati imaju izraženu naboranu površinu i sferičniji oblik u odnosu na preostale inkapsulate, dok su kod NA_{IG}, NA-GA_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata vidljiva udubljenja na površini. Može se primijetiti da NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulati imaju najgladju površinu u usporedbi s ostalim inkapsulatima. Osim parametara veličine i oblika, površina inkapsulata također ima ulogu u otpuštanju inkapsuliranih aktivnih spojeva. Sve što uzrokuje naboranu površinu, kao

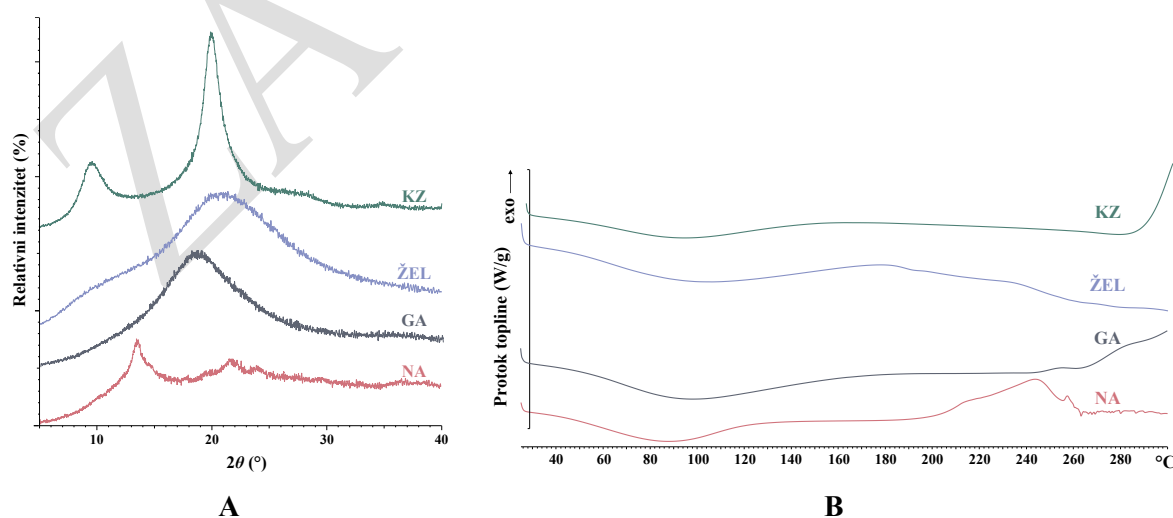
što se vidi kod NA_{IG} , $NA-GA_{IG}$ i $NA-\dot{Z}EL_{IG}$ inkapsulata, uzrokuje i dodatno povećanje kontaktne površine tijekom *in vitro* otpuštanja, što omogućuje brže otpuštanje inkapsuliranih fenolnih spojeva.



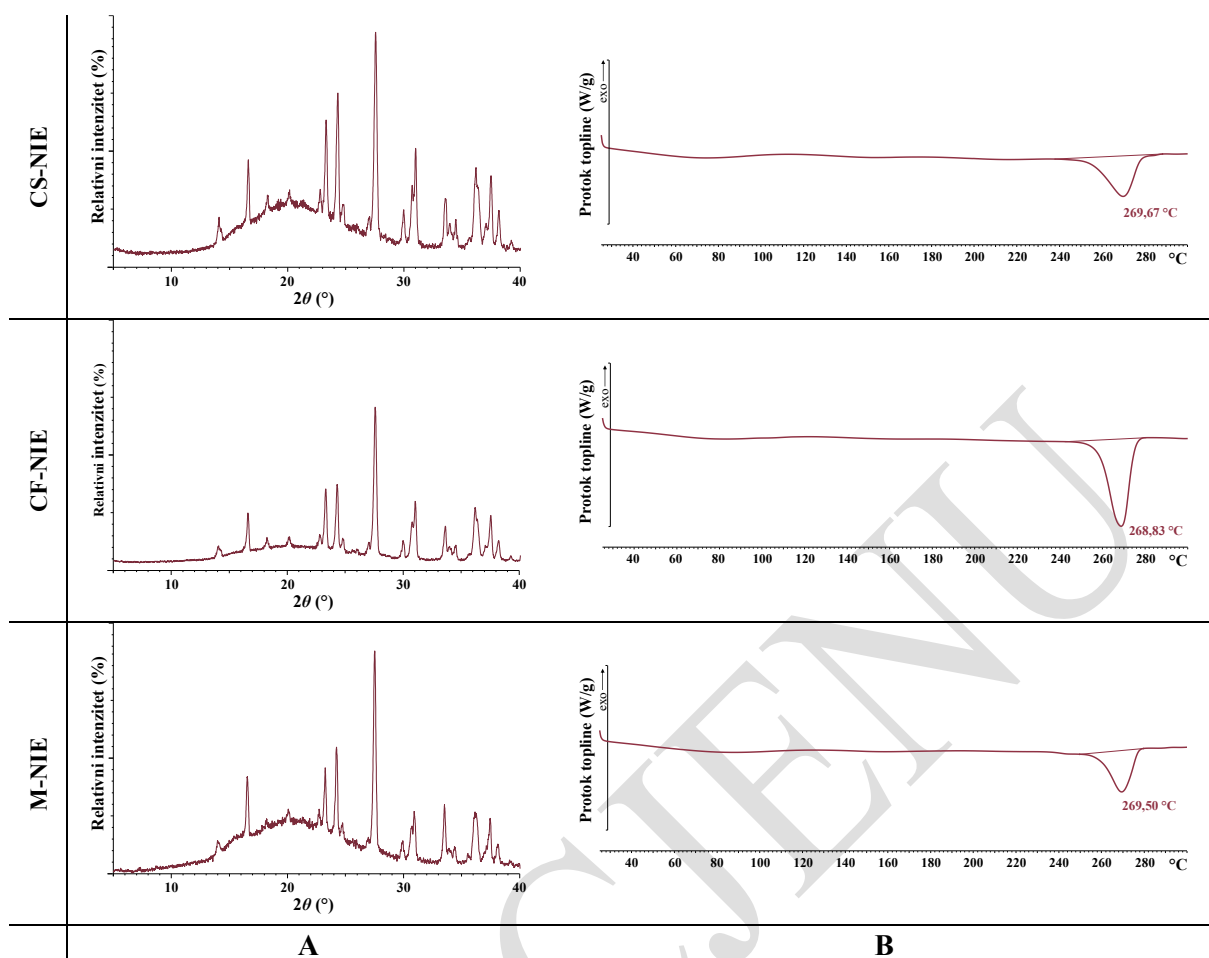
Slika 4.12 SEM slike CS inkapsulata, CF inkapsulata i M inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG} , $NA-GA_{IG}$, $NA-\dot{Z}EL_{IG}$, $NA(1,5KZ)_{IG}$) sa povećanjem 30x i 1000x

4.4.3.3. Termofizikalna analiza strukture omotača, ekstrakata i njihovih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem

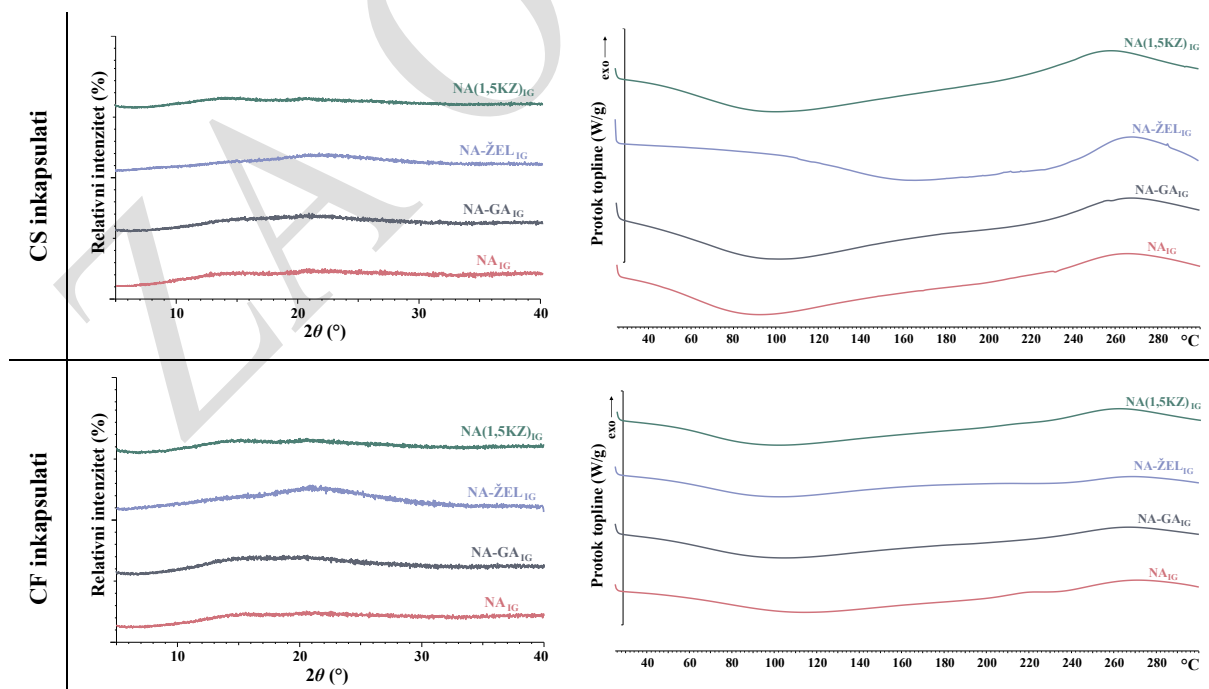
Provedene su XRPD i DSC analize omotača korištenih za inkapsulaciju, CS CF i M ekstrakata tropa grožđa i njihovih inkapsulata. Rezultati XRPD analize pokazuju da omotači NA, GA i ŽEL imaju amorfnu strukturu, a KZ polukristalnu strukturu (**Slika 4.13 A**), dok su svi ispitivani ekstrakti (CS-NIE, CF-NIE, M-NIE) imali kristalnu strukturu što se očituje kao oštri vrhovi na XRPD difraktogramima (**Slika 4.13 A**). Što se tiče toplinskog ponašanja promatranog pomoću DSC-a, NA i GA pokazuju široki endotermni vrh u rasponu niskih do srednjih temperatura (60 – 120 °C), što je povezano s dehidracijom. S druge strane, u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora poput Guan i Zhong (2015), GA pokazuje veću toplinsku stabilnost jer njezin termogram ne prikazuje egzotermni događaj, što znači da može podnijeti više temperature bez degradacije. DSC termogram KZ-a na nižim temperaturama prikazuje endotermni događaj, što se pripisuje gubitku vezane vode iz njegove polimerne strukture, a odsutnost jasno definiranog vrha taljenja na višim temperaturama ukazuje na amorfnu prirodu kitozana i njegovu postupnu toplinsku razgradnju (Kittur i sur., 2002). Nasuprot tome, uočena degradacija NA na visokim temperaturama, posebno na 240 – 260 °C (**Slika 4.13 B**), u skladu je s rezultatima Barra i sur. (2019). Gubitak vode iz ŽEL događa se u nešto širem temperaturnom rasponu (50 – 176 °C) i prati ga izraženi endotermni vrh između 230 °C i 250 °C, što predstavlja denaturaciju ili topljenje njezine spiralne strukture. Dai i sur. (2006) objavili su da ovaj prijelaz odražava strukturnu stabilnost i jedinstveni poredak koji se pripisuje spiralnoj strukturi želatine. Iz rezultata DSC-a može se vidjeti da ispitani omotači imaju amorfnu strukturu, što potvrđuje dobivene rezultate XRPD analize (**Slika 4.13 B**).

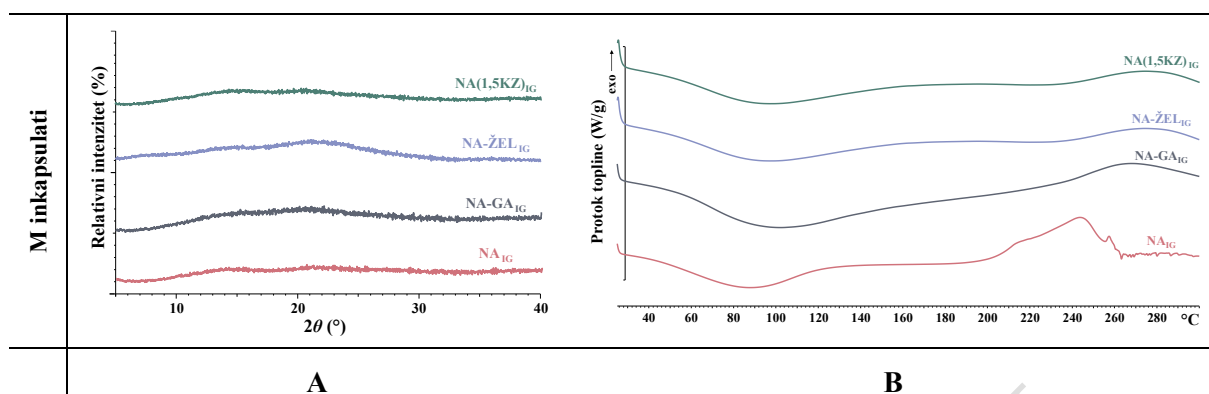


Slika 4.13 XRPD difraktogrami (**A**) i DSC termogrami (**B**) korištenih omotača (NA, GA, ŽEL i KZ) za inkapsulaciju ekstrakata tropa grožđa



Slika 4.14 XRPD difraktogrammi (A) i DSC termogrammi (B) neinkapsuliranih (NIE) CS, CF i M ekstrakata tropa grožđa



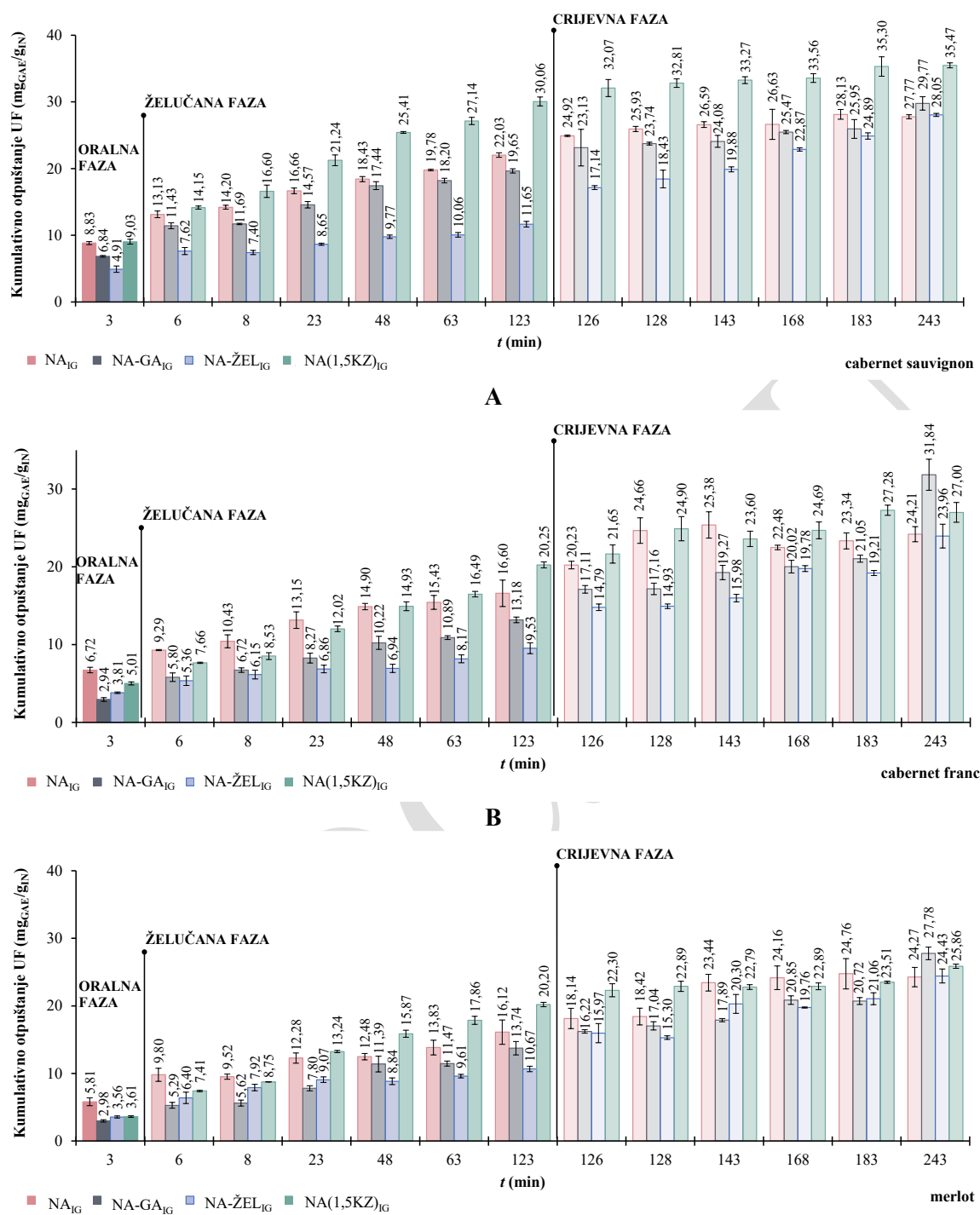


Slika 4.15 XRPD difraktogrami (A) i DSC termogrami (B) CS, CF i M inkapsulata pripremljenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG})

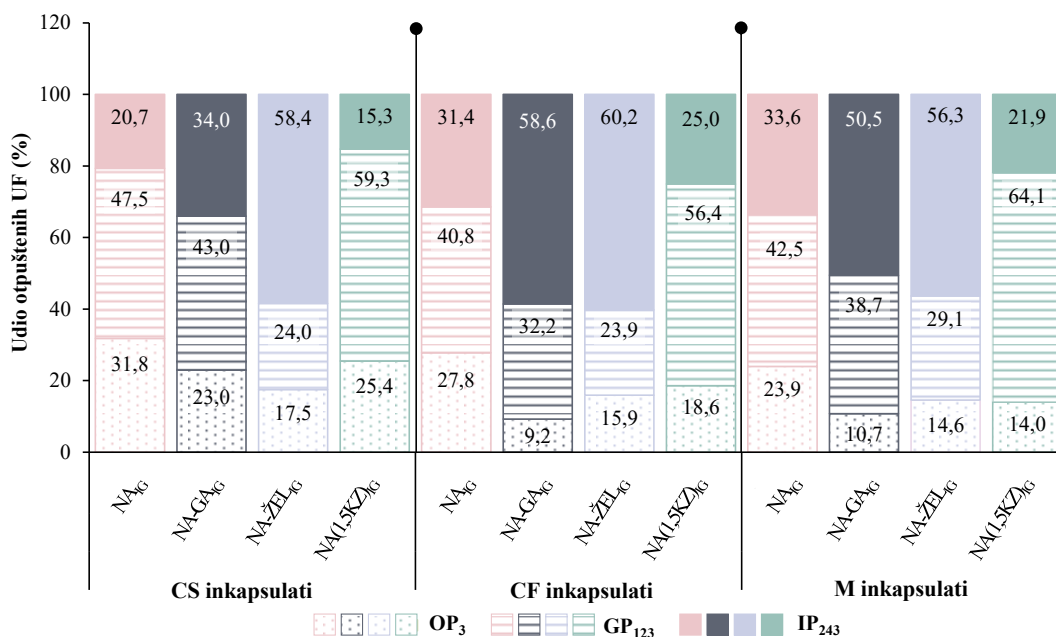
Analiza strukture svih CS, CF i M inkapsulata pokazala je stabilan amorfni oblik, budući da se struktura nije promijenila nakon 3 mjeseca. Ovi rezultati su također potvrđeni DSC analizom (Slika 4.15 B). Iz DSC krivulja su vidljivi blago široki vrhovi kod omotača (Slika 4.13 B) i inkapsulata (Slika 4.15 B), što ukazuje na gubitak slobodne vode prisutne u uzorcima (Archana i sur., 2013a; Arab i sur., 2021). Kod DSC krivulja za ekstrakte, vidljiv je endotermni vrh s prijelazima na 268,83 – 269,67 °C, što je karakteristična pojava kada dolazi do taljenja kristalinih ekstrakata prilikom provedbe ove analize (Slika 4.14 B). Mnoga su istraživanja potvrdila te promjene iz kristalne u amorfnu strukturu tijekom inkapsulacije (Uhljar i sur., 2021; Costa i sur., 2022). Ova promjena igra važnu ulogu u probavljivosti ekstrakata, budući da je ekstrakt u kristalnom obliku manje dostupan za apsorpciju zbog smanjene mogućnosti prolaska kroz crijevnu membranu (Alminger i sur., 2014).

4.4.3.4. Profil i kinetika otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz različitih suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem

Profil kumulativnog otpuštanja *in vitro* UF-a iz CS, CF i M inkapsulata, dobivenih ionskim geliranjem te naknadnim sušenjem hidrogelova zamrzavanjem, praćeno je kroz tri faze probave (OP, GP, i IP) korištenjem otopina elektrolita bez enzima koje simuliraju uvjete u ljudskom probavnom traktu (Slika 4.16). Udio otpuštenih UF-a u svakoj fazi probave od ukupno otpuštenih UF-a nakon kompletne probave prikazan je Slikom 4.17.



Slika 4.16 Kumulativno otpuštanje UF-a iz CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata (IN u indeksu mjerne jedinice) dobivenih inkapsulacijom ionskim geliranjem (IG u indeksu) pomoću omotača NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG}



Slika 4.17 Udio otpuštenih UF-a iz CS, CF, M inkapsulata, pripremljenih ionskim geliranjem s različitim omotačima (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG}), na kraju svake gastrointestinalne faze: OP₃ – oralne faze, GP₁₂₃ – želučane faze, IP₂₄₃ – crijevne faze (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave)

Pore u alginatnoj mreži imaju veliki utjecaj na otpuštanje bioaktivnih tvari iz inkapsulata, a dodavanje omotača natrijevom alginatu može utjecati na popunjavanje tih pora i rezultirati „odgođenim otpuštanjem“ (López Córdoba i sur., 2013). U cilju zaštite fenolnih spojeva od razgradnje tijekom prolaska kroz oralnu i želučanu fazu, te istovremenog omogućavanja sigurnog transporta i postupnog otpuštanja u crijevnoj fazi, NA omotaču su dodani GA, ŽEL i KZ. Crijeva su poželjno mjesto za otpuštanje fenolnih spojeva jer pružaju veću mogućnost apsorpcije i omogućuju ispoljavanja poželjnih svojstava fenolnih spojeva poput protuupalnih, antikarcinogenih, antimikrobnih i brojnih drugih (Grgić i sur., 2020a).

Općenito, u kratkoj OP fazi odvijala se brza difuzija fenolnih spojeva u okolnu elektrolitnu otopinu kao i otpuštanje fenolnih spojeva sa površine inkapsulata. Difuzija se zatim nastavila tijekom GP. Za vrijeme otpuštanja u GP, uz promjenu pH vrijednosti iz neutralne u kiselu, boja otopine elektrolita s inkapsulatima postala je intenzivno crvena što je posljedica otpuštanja antocijana prisutnih u ekstraktima tropa grožđa. Tijekom 120-minutne GP faze, svi ispitivani inkapsulati zadržali su sferični oblik. Nakon što su inkapsulati prešli u IP fazu, boja otopine elektrolita postala je smeđa, što ukazuje na razgradnju prisutnih pigmenta. Tijekom ove faze, inkapsulati su se postupno razgradili, jer se natrijevi ioni u elektrolitnoj otopini koja simulira crijevu fazu izmjenjuju s dvovalentnim kalcijevim ionima koji se nalaze u strukturi inkapsulata. Ova izmjena uzrokuje elektrostatsko odbijanje između negativno nabijenih COO-

skupina u alginatnoj strukturi te uzrokuje opuštanje mreže *egg box* strukture inkapsulata i oni se raspadaju (Bajpai i Sharma, 2004).

Rezultati pokazuju da je 5,81 – 8,83 mg_{GAE}/g_{IN} otpušteno iz svih NA_{IG} inkapsulata u OP (Slika 4.16) što čini 23,9 – 31,8 % od ukupno otpuštenih UF-a tijekom kompletne probave (Slika 4.17.) To je ujedno i najveći udio otpuštenih UF-a tijekom OP od svih ispitanih inkapsulata (Slika 4.17). Najveće otpuštanje UF-a kod NA_{IG} inkapsulata zabilježeno je u GP fazi (9,29 – 22,03 mg_{GAE}/g_{IN} odnosno 40,8 – 47,5 %), a u IP je uočen pad kumulativnog otpuštanja što se očitovalo i u nižem udjelu otpuštenih UF-a (20,7 – 33,6 %) (Slike 4.16 i 4.17). Dodavanjem dodatnog omotača natrij alginatu, postignuto je tzv. odgođeno otpuštanje vidljivo kao slabije otpuštanje UF-a u OP i GP fazama te veće otpuštanje u IP fazi (Slika 4.17). Ipak, sličan trend otpuštanja UF-a kao i NA_{IG} inkapsulati pokazuju i NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulati čiji je najveći udio otpuštenih UF-a također uočen u GP fazi (7,41 – 30,06 mg_{GAE}/g_{IN} odnosno 56,4 – 64,1 %) (Slike 4.16 i 4.17). To je vjerojatno zbog toga što su u kiselom mediju amino skupine kitozana ionizirane, a hidroksilne skupine fenolnih spojeva deprotonirane, što dovodi do bubrenja inkapsulata i omogućuje lakše otpuštanje fenolnih spojeva (Liang i sur., 2017; Costa i sur., 2021). Ako se pretpostavi da je otpuštanje UF-a iz inkapsulata povezano i s njihovim morfološkim karakteristikama, veće otpuštanje iz ovih inkapsulata tijekom OP i GP ukazuje na prisutnost vrlo malih pora. Ove pore omogućavaju probavnim otopinama lakše prodiranje u inkapsulate što rezultira bržom difuzijom i otpuštanjem UF-a. Prema istraživanju drugih autora (Stoica i sur., 2013), fenolni spojevi ekstrahirani iz plodova šipka i inkapsulirani s NA te kombinacijom NA i KZ pokazali su otpuštanje od 40,7 % u želučanoj i još 3,7 % u crijevnoj fazi iz NA inkapsulata. Nadalje, koristeći 1 % KZ pomiješanog s CaCl₂ utvrdili su da je otpušteno nešto manje od 80 % u želučanoj i još 15,4 % u crijevnoj fazi. S druge strane, Yousefi i sur. (2020) inkapsulirali su ekstrakt *Viola odorata* L. pomoću NA i KZ (1 %, w/v) metodom emulzifikacije nakon koje je uslijedilo vanjsko geliranje te je utvrđeno manje otpuštanje UF-a u želučanoj, a više u crijevnoj fazi. Ovi rezultati ukazuju da način dodavanja KZ, kao i njegova koncentracija, utječu na otpuštanje bioaktivnih spojeva iz pripremljenih inkapsulata.

Nadalje, iz svih NA-GA_{IG} inkapsulata otpušteno je 2,94 – 6,84 mg_{GAE}/g_{IN} u OP fazi, 5,29 – 19,65 mg_{GAE}/g_{IN} u GP te 16,22 – 37,84 mg_{GAE}/g_{IN} u IP fazi, odnosno 9,2 – 23,0 % u OP, 32,2 – 43,0 % u GP i 34,0 – 58,6 % u IP fazi (Slike 4.16 i 4.17). GA je polimer s amfolitskim svojstvima koji privlači negativno nabijene molekule alginata putem elektrostatskih sila, dok ioni kalcija također reagiraju s karboksilnim skupinama GA. U svojem istraživanju, Tsai i sur. (2017) inkapsulirali su fenolne spojeve iz nusproizvoda soka rotkvice koristeći NA i GA kao

omotače metodom obrnute sferifikacije gdje su se fenolni spojevi oslobađali brže u crijevnoj nego u želučanoj fazi pri *in vitro* uvjetima otpuštanja. Prilikom istraživanja dodavanja različitih koncentracija GA omotaču NA, zaključili su da koncentracija GA značajno utječe na očuvanje fenolnih spojeva u želučanoj fazi (Tsai i sur., 2017).

Iz **Slike 4.16 A – C** vidljivo je da kumulativno otpuštanje iz svih NA-ŽEL_{IG} inkapsulata ima konstantan porast otpuštenih UF-a tijekom faza probave gdje je u OP otpušteno 3,56 – 4,91 mg_{GAE}/g_{IN}, zatim u GP 5,36 – 11,65 mg_{GAE}/g_{IN}, a u IP 23,96 – 28,05 mg_{GAE}/g_{IN} što je odgovaralo otpuštanju od 39,8 % do 43,7 % ukupno u OP i GP fazama, te preostalih 56,3 do 60,2 % UF-a u IP fazi (**Slika 4.17**). NA-ŽEL_{IG} inkapsulati imaju nabranu površinu s mnogo udubljenja, no pri većem povećanju tijekom SEM analize pore nisu vidljive (**Slika 4.12**). Sporije otpuštanje UF-a iz NA-ŽEL_{IG} inkapsulata u ranijim fazama probave u odnosu na ostale inkapsulate također može biti povezano s većim EE_{IG} u odnosu na ostale omotače gdje je veći EE_{IG} uzrokovan činjenicom da se fenolni spojevi čvrsto vežu za proteine kojima pripada i želatina. Stoga, fenolnim spojevima koji su jače vezani, treba više vremena da se oslobode iz mreže NA-ŽEL.

Za opisivanje kinetike i mehanizma otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz pripremljenih inkapsulata korišteni su ranije opisani modeli prvog reda, Higuchi, Korsmeyer-Peppas i Hixson-Crowell model. Parametri modela i statistički kriteriji korišteni za procjenu uspješnosti aproksimacije eksperimentalnih podataka modelima (detaljno su opisani u **poglavlju 4.4.2.5**), prikazani su u **Tablici 4.21**. Nadalje, grafički prikaz kinetike otpuštanja UF-a iz svih ispitivanih inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa opisane s ispitanim matematičkim modelima pokazuje **Slika P1.3**.

Tablica 4.21 Procijenjeni **parametri** primijenjenih **matematičkih modela** za opisivanje kinetike **otpuštanja UF-a** (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} – konstante otpuštanja za odgovarajući model; n – eksponent difuzije) iz **CS, CF i M inkapsulata** pripremljenih ionskim geliranjem pomoću **različitih omotača** (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) te statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela (R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije, AIC – Akaike informacijski kriterij, MSC – kriterij odabira modela)

		Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela											
		CSE				CFE				ME			
Matematički modeli		NA _{IG}	NA-GA _{IG}	NA-ŽEL _{IG}	NA(1,5KZ) _{IG}	NA _{IG}	NA-GA _{IG}	NA-ŽEL _{IG}	NA(1,5KZ) _{IG}	NA _{IG}	NA-GA _{IG}	NA-ŽEL _{IG}	NA(1,5KZ) _{IG}
Model prvog reda	R^2_{adj}	0,692	0,690	0,815	0,831	0,782	0,836	0,840	0,887	0,704	0,872	0,749	0,880
	AIC	133,945	114,796	108,980	109,170	132,179	120,547	124,080	120,977	135,396	118,317	129,892	121,264
	MSC	0,548	0,590	1,313	1,155	1,027	1,499	1,518	1,765	0,760	1,727	1,017	1,676
	k_1	0,029	0,018	0,009	0,028	0,028	0,006	0,009	0,017	0,016	0,007	0,009	0,022
Higuchi model	R^2_{adj}	0,680	0,836	0,895	0,763	0,789	0,914	0,902	0,939	0,829	0,957	0,876	0,901
	AIC	134,613	105,891	101,097	113,980	131,606	110,168	116,161	111,145	126,454	100,779	118,540	118,120
	MSC	0,506	1,226	1,876	0,811	1,063	2,148	2,013	2,380	1,319	2,823	1,726	1,872
	k_H	7,905	6,874	5,819	7,742	7,981	5,113	5,756	7,343	7,338	5,595	6,001	7,355
Hixson-Crowell model	R^2_{adj}	0,538	0,609	0,765	0,721	0,705	0,843	0,795	0,829	0,661	0,851	0,703	0,807
	AIC	140,504	118,069	112,351	116,260	136,952	119,920	128,028	127,617	137,559	120,805	132,544	128,854
	MSC	0,138	0,356	1,072	0,649	0,729	1,538	1,271	1,350	0,625	1,571	0,851	1,202
	k_{HC}	0,006	0,004	0,003	0,006	0,006	0,002	0,003	0,004	0,004	0,002	0,003	0,006
Korsmeyer-Peppas model	R^2_{adj}	0,973	0,966	0,808	0,973	0,891	0,864	0,830	0,983	0,871	0,936	0,844	0,967
	AIC	95,693	84,535	110,410	84,141	121,894	118,416	125,896	91,252	122,907	108,08	122,954	101,592
	MSC	2,939	2,751	1,211	2,943	1,670	1,632	1,404	3,623	1,541	2,366	1,450	2,905
	k_{KP}	28,240	20,290	11,670	22,548	23,452	7,488	9,732	13,824	21,344	7,816	12,665	15,617
	n	0,236	0,275	0,338	0,288	0,263	0,405	0,373	0,373	0,280	0,422	0,333	0,343

Podebljano su označeni statistički kriteriji modela koji najbolje opisuju otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz pojedinih inkapsulata. Indeks IG odnosi se na inkapsulaciju ionskim geliranjem.

Prema analizi rezultata prikazanih u **Tablici 4.21**, može se zaključiti da otpuštanje UF-a iz NA_{IG} i $NA(1,5KZ)_{IG}$ inkapsulata sva tri ekstrakta tropa grožđa najbolje opisuje Korsmeyer-Peppas model što potvrđuju visoki prilagođeni koeficijent determinacije (R^2_{adj}) s vrijednostima u rasponu od 0,871 do 0,983, niski AIC kriterij s vrijednostima u rasponu od 84,141 do 122,907 te odgovarajuće vrijednosti koeficijenta MSC u rasponu od 1,541 do 3,623. Budući da veće vrijednosti konstante otpuštanja (k_{KP}) ukazuju na brže otpuštanje fenolnih spojeva iz inkapsulata može se zaključiti da se otpuštanje fenolnih spojeva brže odvijalo iz svih NA_{IG} inkapsulata ($k_{KP} = 21,344 - 28,240$) u odnosu na sve ispitivane $NA(1,5KZ)_{IG}$ inkapsulate ($k_{KP} = 13,824 - 22,548$) (**Tablica 4.21**). Već u OP, 23,9 – 31,8 % UF-a otpušteno je iz NA_{IG} inkapsulata bez obzira na inkapsulirani ekstrakt, dok je iz $NA(1,5KZ)_{IG}$ inkapsulata otpušteno tek između 14,0 i 25,4 % (**Slika 4.17**). Za ove inkapsulate vrijednosti eksponenta difuzije (n) bile su niže od 0,43 što i ovdje ukazuje na to da je otpuštanje fenolnih spojeva u slučaju NA_{IG} i $NA(1,5KZ)_{IG}$ inkapsulata slijedilo Fickov zakon difuzije. Dodatno, vrijednosti parametra n niže od 0,43 potvrđuju da su inkapsulati sferičnog oblika kao što je vidljivo i na SEM slikama (**Slika 4.12**) te iz parametara oblika inkapsulata (**Tablica 4.19**).

Otpuštanje UF-a iz svih $NA-ŽEL_{IG}$ inkapsulata odvijalo se također prema Fickovom zakonu difuzije, no za aproksimaciju eksperimentalnih podataka najprikladniji se pokazao Higuchi model ($R^2_{adj} = 0,876 - 0,902$; $AIC = 101,097 - 118,540$; $MSC = 1,726 - 2,013$) (**Tablica 4.21**). S druge strane, otpuštanje iz $NA-GA_{IG}$ inkapsulata pratilo je Korsmeyer-Peppas u slučaju CS inkapsulata i Higuchi model kod CF i M inkapsulata kako je prikazano u **Tablici 4.21**. Ovi rezultati ukazuju na složenost procesa otpuštanja UF-a iz inkapsulata koji ovisi o kombinaciji difuzije i drugih faktora poput geometrijskih karakteristika inkapsulata. Primjetno je da su CS- $NA-GA_{IG}$ inkapsulati imali veću površinu, opseg i $Feret_{MAX}$ u usporedbi s ostalim (CF i M) $NA-GA_{IG}$ inkapsulatima. Također, kružnost i zaobljenost CS- $NA-GA_{IG}$ inkapsulata je bila nešto manja, a izmjerena tvrdoća nešto veća u odnosu na CF- $NA-GA_{IG}$ i M- $NA-GA_{IG}$ inkapsulate (**Tablica 4.19**). Nadalje, analizom SEM slika, primijećena je prisutnost pukotina na prikazanim CS- $NA-GA_{IG}$ inkapsulatima (**Slika 4.12**). Sve ove karakteristike inkapsulata mogu utjecati na brže otpuštanje UF-a, što potvrđuju podaci da je iz CS- $NA-GA_{IG}$ inkapsulata tijekom OP i GP otpušteno 66,0 % UF-a, dok je za CF- $NA-GA_{IG}$ i M- $NA-GA_{IG}$ taj postotak iznosio 41,4 – 49,5 % (**Slika 4.17**).

Na temelju provedenih istraživanja u poglavlju 4.4.3 može se zaključiti da je inkapsulacija fenolnih spojeva iz ekstrakata tropa grožđa (CS, CF i M) pomoću odabranih omotača (NA_{IG} , $NA-GA_{IG}$, $NA-ŽEL_{IG}$ i $NA(1,5KZ)_{IG}$) značajno poboljšala EE_{IG} , fizikalna svojstva inkapsulata

i profil otpuštanja fenolnih spojeva. Najveća EE_{IG} postignuta je kod inkapsulata NA-ŽEL_{IG} koja (52,63 – 69,27 %) pri čemu je omotač imao znatno veći utjecaj na EE_{IG} od samog ekstrakta. U odnosu na NA_{IG} inkapsulate NA-ŽEL_{IG} inkapsulati imali su 1,4 – 2,1 puta veću EE_{IG} .

Analiza veličine, oblika i teksture pokazala je da su ovi parametri ovisni o korištenom omotaču, ekstraktu i njihovom zavisnom djelovanju pri čemu je omotač imao dominantan utjecaj. Ove razlike u veličini, obliku, tvrdoći i površinskim svojstvima pokazale su se važnima za ponašanje inkapsulata tijekom *in vitro* otpuštanja UF-a. Nadalje, XRPD i DSC analize pokazale su da su natrijev alginat, guma arabika i želatina amorfne strukture, kitozan polukristalne, a ekstrakti kristalne strukture. Inkapsulacijom je došlo do prijelaza ekstrakata u amorfni oblik, što doprinosi stabilnosti inkapsulata i njihovoj poboljšanoj topljivosti te u konačnici većoj biodostupnosti.

Analizom profila otpuštanja UF-a pokazano je da većina inkapsulata prati trend povećanog otpuštanja UF-a u želučanoj fazi i smanjenog u crijevnoj fazi probave. Ipak, CF-NA-GA_{IG}, M-NA-GA_{IG} te svi NA-ŽEL_{IG} inkapsulati pokazali su povoljniji profil s većim udjelom UF-a otpuštenim u crijevnoj fazi (50,5 – 60,2 %), što je najpoželjnije s obzirom na mjesto apsorpcije fenolnih spojeva. Uočene su i razlike među ekstraktima, pri čemu je iz CS inkapsulata otpušten veći udio UF-a u želučanoj, a iz CF i M inkapsulata u crijevnoj fazi. Prevladavajući mehanizam otpuštanja UF-a iz inkapsulata bila je difuzija, a kinetiku otpuštanja iz NA_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata najbolje opisano Korsmeyer–Peppas model, dok je za NA-ŽEL_{IG} inkapsulate najprikladniji bio Higuchi model. Kod NA-GA_{IG} inkapsulata kinetika otpuštanja ovisila je o inkapsuliranom ekstraktu što dodatno potvrđuje složenost procesa otpuštanja povezanog s fizikalnim i strukturnim svojstvima inkapsulata.

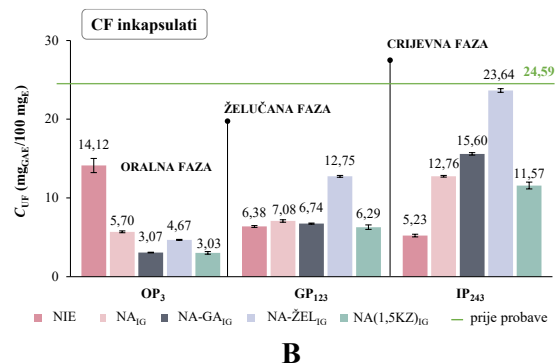
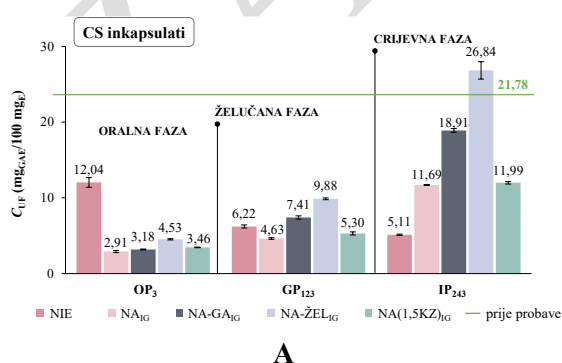
4.4.4. Biodostupnost fenolnih spojeva iz različitih suhih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem - utjecaj omotača i ekstrakta

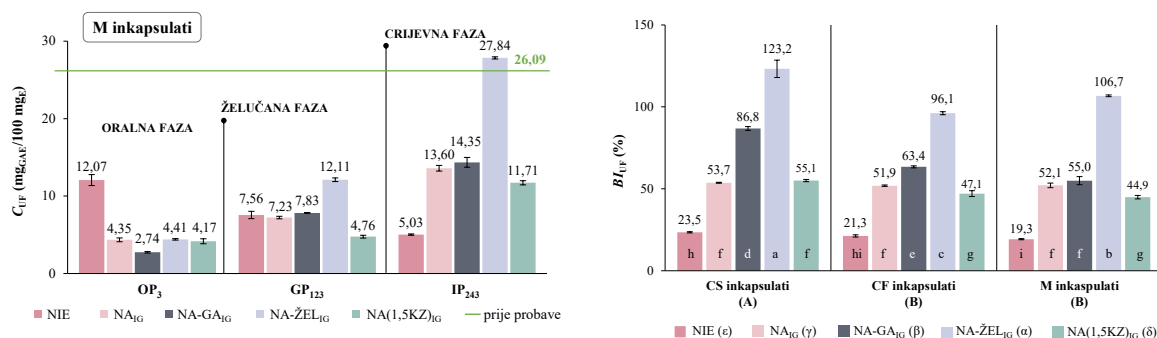
Ekstrakti CS-NIE, CF-NIE i M-NIE te CS, CF i M inkapsulati dobiveni ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG}) podvrgnuti su *in vitro* simuliranoj probavi gornjeg probavnog trakta uz prisustvo probavnih enzima prema standardiziranom INFOGEST protokolu (Brodkorb i sur., 2019). Simulirana probava provodila se kroz OP, GP i IP fazu. Tijekom provedbe simulirane probave u određenim vremenskim intervalima su prikupljani su uzorci koji su pročišćeni te su u njima analizirane koncentracije otpuštenih UF-a, UFL-a, UPA i pojedinačnih fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavanola, flavonola, stilbena i antocijana) u svrhu ispitivanja utjecaja omotača i ekstrakta na profil

otpuštanja analiziranih spojeva te njihovu biodostupnost izraženu kao indeks biodostupnosti (*BI*) ekstrakata i inkapsulata. Praćenje otpuštanja ovih aktivnih tvari tijekom simulirane probave pruža uvid u to koliko dobro inkapsulacija različitim omotači mogu zaštititi ove spojeve i utjecati na njihovo kontrolirano otpuštanje. Koncentracije fenolnih spojeva prije probave (Slike 4.2, 4.18 – 4.20, Tablica 4.3) i nakon probave ekstrakata i inkapsulata (Tablice P1.1 – P1.3) su izražene kao maseni udjeli fenolnih spojeva (mg (μ g) fenolnog spoja na 100 mg ekstrakta), a *BI* je izračunat prema izrazu (3.31). Više vrijednosti *BI* za fenole ukazuju na učinkovit proces inkapsulacije odnosno zaštitu fenolnih spojeva u ranijim fazama probave i omogućavanje njihovog značajnijeg oslobađanja u crijevima što je najpoželjniji profil otpuštanja budući da se u crijevima najvećim dijelom odvija njihova apsorpcija.

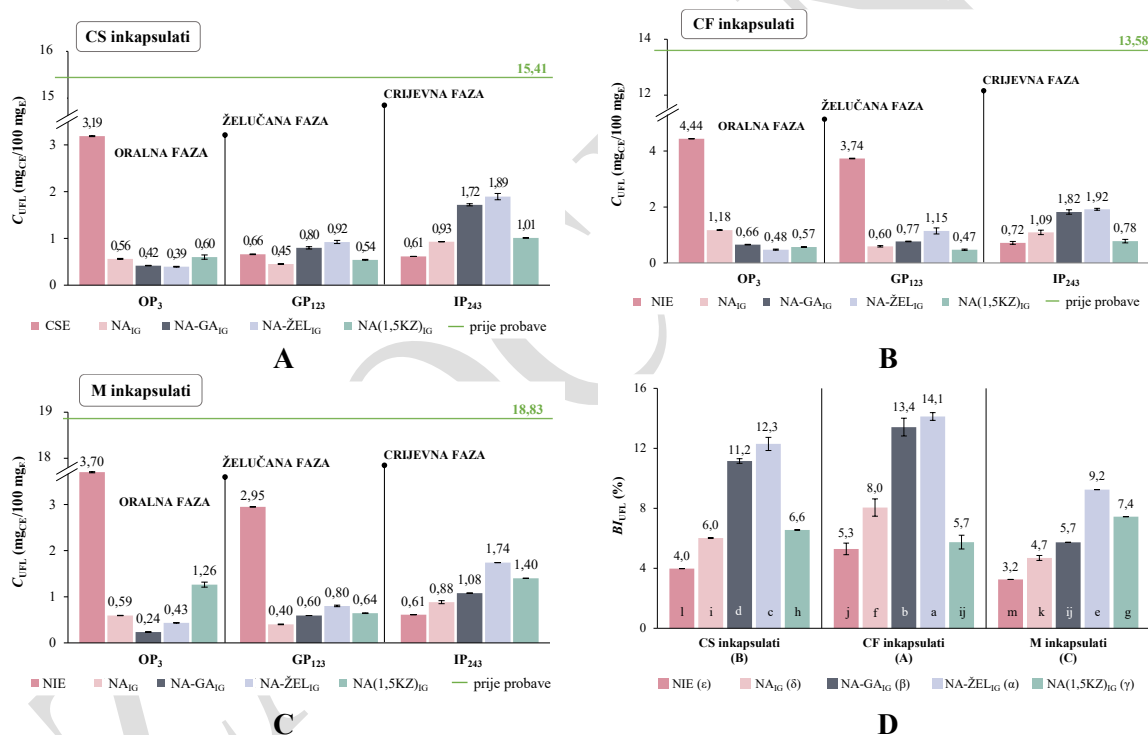
4.4.4.1. Biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoids i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

Maseni udio kumulativno otpuštenih UF-a, UFL-a i UPA-a iz NIE i inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa u probavne tekućine na kraju OP, GP i IP te *BI* vrijednosti za navedene uzorke nakon kompletne simulirane probave prikazani su na Slikama 4.18 – 4.20 (A – D). U slučaju svih ispitivanih NIE tropa grožđa uočen je isti trend kumulativnog otpuštanja za UF, UFL i UPA. Najveće kumulativno otpuštanje UF-a (12,04 – 14,12 mg_{GAE}/100 mg_E), UFL-a (3,19 – 4,44 mg_{CE}/100 mg_E) i UPA-a (1,46 – 2,12 mg/100 mg_E) uočeno je tijekom OP, a potom je koncentracija navedenih spojeva u probavnim otopinama opadala do kraja IP (Slike 4.18 – 4.20 (A, B, C)) što je posljedično uzrokovalo relativno niske vrijednosti *BI* za UF (19,3 – 23,5 %), UFL (3,2 – 5,3 %) te UPA (1,5 do 4,0 %) u NIE uzorcima (Slike 4.18 – 4.20 (D)).

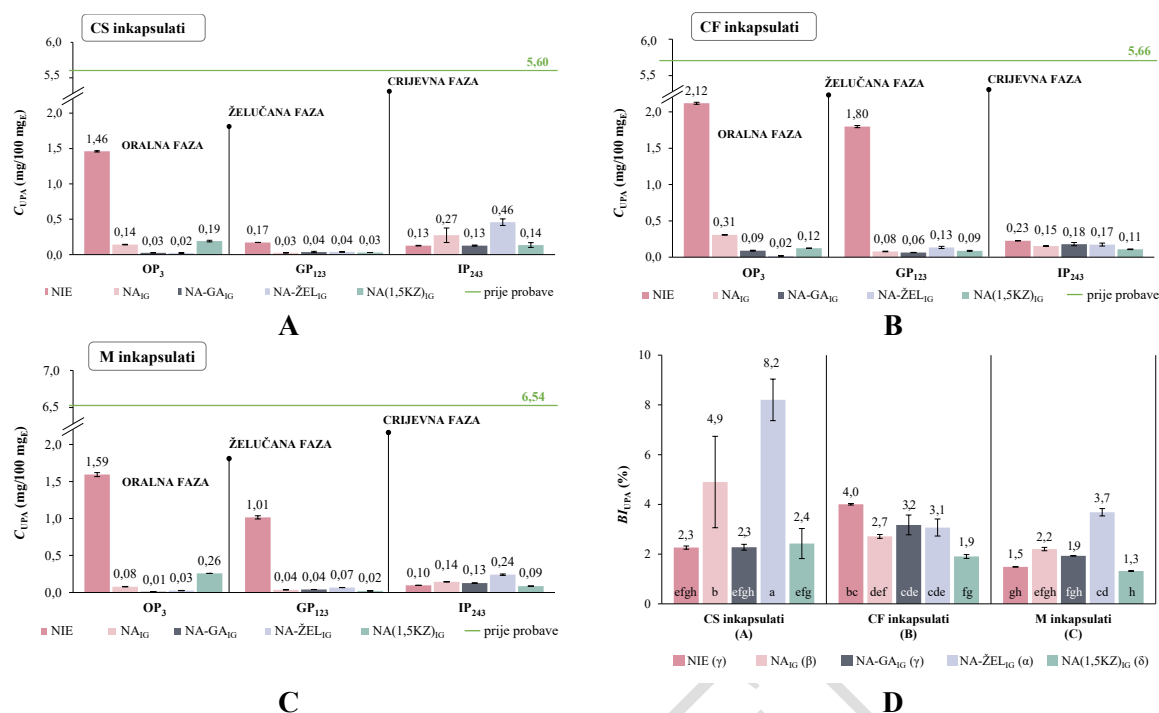




Slika 4.18 Maseni udio UF-a (C_{UF} , mg_{GAE}/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UF-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) te indeks biodostupnosti (BI_{UF}) UF-a ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$



Slika 4.19 Maseni udio UFL-a (C_{UFL} , mg_{GAE}/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UFL-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) te indeks biodostupnosti (BI_{UFL}) UFL-a ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$



Slika 4.20 Maseni udio UPA (C_{UPA} , mg/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UPA na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ZEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) te indeks biodostupnosti (BI_{UPA}) UPA ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$

U slučaju inkapsuliranih ekstrakata tropa grožđa uočen je drugačiji trend otpuštanja u odnosu na NIE. Kod CS, CF i M inkapsulata, pripremljenih s omotačem NA_{IG} maseni udio kumulativno otpuštenih UF-a rastao je od OP preko GP prema IP fazi gdje je taj udio bio za 1,8 – 2,5 puta viši u odnosu na GP fazu. Veće otpuštanje UF-a u IP fazi posljedično je rezultiralo i višim BI_{UPA} vrijednostima (51,9 – 53,7 %) kod NA_{IG} u odnosu na NIE (Slika 4.18). Postupno povećanje otpuštanja UF-a iz inkapsulata prema crijevnoj fazi (OP < GP < IP) može se objasniti odgovorom alginata na pH okolne otopine. Pri niskom pH u GP fazi (pH 3), pH je niži od pKa vrijednosti glukuronske kiseline (pKa = 3,65) i manuronske kiseline (pKa = 3,38) od kojih se sastoji NA što uzrokuje da struktura kalcija i alginata tvori stabilnu vodikovu vezu i zadržava fenolne spojeve u inkapsulatu. Međutim, pri pH vrijednosti višoj od pKa vrijednosti alginatnih monomera kakva vlada u IP fazi, može doći do pucanja mreže vodikovih veza, što dovodi do bubrenja alginatnih inkapsulata i time do otpuštanja fenolnih spojeva (Chuang i sur., 2017). Također, alginat se skuplja pri niskim pH vrijednostima i inkapsulirani spojevi se ne oslobađaju ili pak oslobađaju u manjoj mjeri. U GP fazi, NA se hidratizira i pretvara u poroznu, netopljivu takozvanu "kožu" alginske kiseline koja se prelaskom u područje veće pH vrijednosti, odnosno

IP fazu, pretvara u topljivi viskozni sloj iz kojeg se lakše otpušta inkapsulirana tvar (George i Abraham, 2006). Utjecaj promjena pH vrijednosti vidljiv je i kod otpuštanja UFL-a iz svih NA_{IG} inkapsulata gdje su niže koncentracije UFL-a zabilježene u želučanoj probavnoj tekućini s obzirom na oralnu tekućinu i to za 1,2 – 2 puta, a zatim je u IP u odnosu na GP detektirana viša koncentracija UFL-a za 1,8 – 2,2 puta (**Slika 4.19 A – C**).

Vrijednosti *BI* Za UFL svih NA_{IG} inkapsulata kretale su se u rasponu od 4,7 % do 8,0 % (**Slika 4.19 D**). Sličan trend otpuštanja kao kod UFL-a iz NA_{IG} inkapsulata uočen je i kod UPA. Prema **Slici 4.20 A – C** vidljiv je pad koncentracije UPA u GP nakon OP faze (osim kod CS inkapsulata) te nakon toga viša koncentracija u IP (1,9 – 10,6 puta) u odnosu na GP fazu. Vrijednosti *BI* su bile relativno niske odnosno kretale su se u rasponu od 2,2 do 4,9 % (**Slika 4.20 D**).

Nadalje, omotač GA pokazuje stabilnost pri različitim pH vrijednostima (Taheri i Jafari, 2019). Tijekom probave NA-GA_{IG} inkapsulata, uočava se sličan trend otpuštanja UF i UFL, odnosno otpuštanje se povećava od OP preko GP prema IP fazi. U IP fazi su određene veće koncentracije UF-a za 1,8 – 2,6 puta te UFL-a za 1,8 – 2,4 puta u odnosu na GP fazu probave (**Slike 4.18 i 4.19 (A, B)**). Tijekom crijevne faze probave dolazi do izmjene iona kalcija iz *egg box* strukture inkapsulata sa fosfatnim ionima otopine elektrolita koja simulira crijevnu fazu probave. To uzrokuje bubrenje inkapsulata (Nayak i sur., 2012), a time i povećano otpuštanje fenolnih spojeva. Nakon simulirane probave NA-GA_{IG} inkapsulata, *BI* UF-a kretao se u rasponu od 55,0 % do 86,8 % (**Slika 4.18 D**), a UFL-a u rasponu od 5,7 % do 13,4 % (**Slika 4.19 D**). Isti trend otpuštanja kao za UF i UFL uočen je i kod otpuštanja UPA iz NA-GA_{IG} inkapsulata koji sadrže CS i M ekstrakte do je uočena razlika kod CF-NA-GA_{IG} inkapsulata gdje je 1,4 puta viša koncentracija UPA određena u OP fazi nego li u GP fazi (**Slika 4.20 A – C**). Ipak, za sve NA-GA_{IG} inkapsulate, najveće otpuštanje UPA zabilježeno je u IP fazi, s *BI* vrijednostima u rasponu od 1,9 % do 3,2 % (**Slika 4.20 D**).

U posljednje vrijeme, istraživanja su usmjerena prema kombinacijama polisaharida i proteina za inkapsulaciju fenolnih spojeva. Ova kombinacija omogućuje vezivanje bioaktivnih spojeva na proteinsku frakciju putem hidrofobnih interakcija i vodikovih veza, dok polisaharidi pomažu u sprječavanju enzimske razgradnje proteina u želučanim uvjetima (Milinčić i sur., 2019). U tom kontekstu, ŽEL, proteinski omotač s izoelektričnom točkom u rasponu pH 6 – 7, očekivano doprinosi stabilnosti inkapsulata tijekom želučane faze. Njezina stabilnost pri nižim pH-vrijednostima i stvaranje kompleksa s drugim omotačima čini želatinu poželjnim omotačem za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva, osobito onih osjetljivih na promjene pH, u svrhu zaštite i

kontroliranog otpuštanja. Iako se ŽEL rijetko koristi za ionsko geliranje fenolnih spojeva, nedavno je privukla zanimanje znanstvene zajednice zbog svoje sposobnosti snažnog vezivanja s fenolnim spojevima putem hidrofobnih interakcija i vodikovih veza (Jakobek, 2015). U ovom radu ŽEL se koristila u kombinaciji s polisaharidom NA.

Tijekom *in vitro* simulirane probave NA-ŽEL_{IG} inkapsulata uočen je veći udio otpuštenih UF-a u fazama probave iza OP faze, a u IP fazi udio UF-a bio je 1,9 – 2,7 puta veći u odnosu na GP fazu (Slika 4.18 A – C). Također, upotrebom ovih omotača postignuto je najveće otpuštanje UF-a na kraju IP u usporedbi sa ostalim inkapsulatima i NIE što je rezultiralo i najvećim vrijednostima *BI* koje su se kretale u rasponu od 96,1 do 123,2 % (Slika 4.18 D). Isti trend otpuštanja iz ovih inkapsulata vidljiv je i kod UFL-a sa utvrđenim 1,7 – 2,2 puta većim koncentracijama UFL-a u IP fazi u odnosu na GP fazu (Slika 4.19 A – C) dok su se izračunate vrijednosti *BI* kretale u rasponu od 9,2 do 14,1 % (Slika 4.19 D). Slika 4.20 A – C prikazuje otpuštanje UPA tijekom *in vitro* simulirane probave koje je slijedilo isti trend kao za UF i UFL dok su se izračunate *BI* vrijednosti kretale u rasponu od 3,1 % do 8,2 % (Slika 4.20 D). Ovakav trend otpuštanja fenolnih spojeva može se objasniti s činjenicom da tijekom inkapsulacije dolazi do povezivanja kroz ionske interakcije između negativno nabijenog alginata i pozitivno nabijene želatine. U uvjetima alkalnog okruženja, disocijacija –COOH funkcionalnih skupina uzrokuje slabljenje fizičkih sila između ova dva polimera (Roy i sur., 2009; Sathisaran i Balasubramanian, 2020) što u konačnici rezultira razgradnjom inkapsulata u IP fazi i većim otpuštanjem fenolnih spojeva.

Polimer koji se, uz NA, najčešće koristi kao omotač za inkapsulaciju je KZ zbog njegove stabilnosti i sposobnosti stvaranja kovalentnih ili ionskih veza s drugim omotačima. Osim toga, KZ ima pozitivan naboj i sadrži protonirane amino skupine koje stupaju u interakciju s negativno nabijenim skupinama fenolnih spojeva što omogućuje bolju inkapsulaciju i veću biodostupnost fenolnih spojeva u crijevnoj fazi probave što je vidljivo i iz rezultata ovog rada. U slučaju korištenog NA(1,5KZ)_{IG} omotača udio otpuštenih UF-a povećavao se od OP prema IP fazi te je uočena 1,8 – 2,5 puta veća koncentracija UF-a u IP nego li u GP fazi (Slika 4.18 A – C) dok je *BI* za UF iznosio od 44,9 % do 55,1 % (Slika 4.18 D). Niske pH vrijednosti uzrokuju elektrostatsko odbijanje molekula KZ što rezultira njegovim bubrenjem. Bubrenje, zajedno s povećanim elektrostatskim odbijanjem, dovodi do stvaranja viskoznog sloja oko kitozana što uzrokuje sporu difuziju fenolnih spojeva u želučanu probavnu otopinu (Lee i sur., 2012). Povećanjem pH vrijednosti okoline prelaskom u IP fazu, dolazi do smanjenja ionizacije protoniranih amino skupina kitozana. To rezultira smanjenjem elektrostatskog odbijanja

između molekula kitozana i olakšava prodiranje vode u inkapsulate te otpuštanje fenolnih tvari. Otpuštanje UFL-a iz $\text{NA}(1,5\text{KZ})_{\text{IG}}$ inkapsulata prati isti trend kao i NA_{IG} inkapsulati, odnosno najmanje koncentracije UFL-a su određene nakon probave u GP te je vidljiv porast koncentracije otpuštenih UFL u IP za 1,6 – 2,2 puta u odnosu na GP (Slika 4.19 A – C) dok su se *BI* vrijednosti za UFL u rasponu od 5,7 do 7,4 % (Slika 4.19 D). Slika 4.20 A – C prikazuje otpuštanje UPA tijekom simulirane probave svih $\text{NA}(1,5\text{KZ})_{\text{IG}}$ inkapsulata gdje je vidljivo da su veće koncentracije UPA zabilježene u OP fazi nego li u GP fazi, ali su i u IP fazi detektirane 1,2 – 4,6 puta veće koncentracije UPA u odnosu na GP fazu dok se *BI* za UPA kretao u rasponu od 1,3 do 2,4 % (Slika 4.20 D). Statistička analiza utjecaja omotača i ekstrakta prema faktorskom ANOVA testu na *BI* vrijednosti prikazana je Tablicama 4.22 – 4.24.

Tablica 4.22 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UFL-a - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{IG} , NA-GA_{IG} , $\text{NA-ŽEL}_{\text{IG}}$) kod inkapsulacije ionskim geliranjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	37029,4	4	9257,4	3106,86	0,0000 *	92,4 %
Ekstrakt	1608,3	2	804,1	269,87	0,0000 *	4,0 %
Omotač × ekstrakt	1346,1	8	168,3	56,47	0,0000 *	3,2 %
Pogreška	89,4	30	3,0			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Tablica 4.23 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UFL-a - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{IG} , NA-GA_{IG} , $\text{NA-ŽEL}_{\text{IG}}$) kod inkapsulacije ionskim geliranjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	351,193	4	87,798	972,01	0,0000 *	68,6 %
Ekstrakt	80,273	2	40,136	444,35	0,0000 *	15,7 %
Omotač × ekstrakt	77,528	8	9,691	107,29	0,0000 *	15,2 %
Pogreška	2,710	30	0,090			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Tablica 4.24 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UPA - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{IG} , NA-GA_{IG} , $\text{NA-ŽEL}_{\text{IG}}$) kod inkapsulacije ionskim geliranjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	51,4408	4	12,8602	40,389	0,0000 *	38,2 %
Ekstrakt	26,7916	2	13,3958	42,071	0,0000 *	19,9 %
Omotač × ekstrakt	46,8605	8	5,8576	18,396	0,0000 *	34,8 %
Pogreška	9,5523	30	0,3184			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Nakon provedene statističke analize prema faktorskom ANOVA testu (Tablice 4.22 – 4.24) dokazano je da su oba ispitivana faktora (omotač i ekstrakt) te njihova međusobna interakcija imali su statistički značajan utjecaj na *BI* vrijednosti UF-a, UFL-a i UPA. Kod svih fenolnih spojeva dominantan je bio utjecaj omotača i to sa 92,4 % varijance kod *BI* vrijednosti za UF, 68,6 % varijance kod *BI* vrijednosti UFL-a i 38,2 % varijance kod *BI* vrijednosti UPA te su najveće vrijednost *BI* svih fenolnih spojeva određene kada je korišten omotač NA-ŽEL_{IG}. Kod UF-a je samo 4,0 % varijance bila posljedica varijabilnosti faktora „ekstrakt“, uz najveće vrijednosti *BI* kod CS inkapsulata, dok je 3,2 % varijance bila posljedica interakcije između ova dva faktora. U slučaju UFL-a, samo 15,7 % varijance bila posljedica varijabilnosti faktora „ekstrakt“ uz najveće vrijednosti *BI* kod CF inkapsulata, a 15,2 % varijance posljedica je interakcije između ova dva faktora. Kod UPA je 19,9 % varijance bila posljedica varijabilnosti faktora „ekstrakt“ uz najveće marginalne srednje vrijednosti *BI* kod CS inkapsulata, te je 34,8 % varijance posljedica interakcije između ova dva faktora.

4.4.4.2. Biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva

Rezultati kumulativnog otpuštanja pojedinačnih fenolnih spojeva (fenolne kiseline, flavanoli, flavonoli, stilbeni, antocijani) iz NIE te inkapsuliranih CS, CF i M ekstrakata ionskim geliranjem tijekom tri faze simulirane probave *in vitro* prikazani su u **Prilozima (Tablice P1.1–1.3)**. Vrijednosti *BI* prikazane su u **Tablici 4.25** ali samo za one ekstrakte i inkapsulate za koje je bilo moguće izračunati *BI* odnosno koji su detektirani nakon kompletne probave odnosno nakon IP faze probave (ukupno 15 spojeva: galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, epikatehin, katehin, epikatehin galat, galokatehin galat, procijanidini B1 i B2, rutin, oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid). Statistička analiza značajnosti utjecaja omotača i ekstrakta na biodostupnost pojedinačnih fenola prikazana u **Tablicama 4.25 i 4.26**.

Tablica 4.25 Biodostupnost (*BI*, %) pojedinačnih fenolnih spojeva iz NIE i različitih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem s obzirom na korišteni omotač (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) i ekstrakt tropa grožđa (CS, CF, M) te statistička značajnost utjecaja omotača i ekstrakta na *BI* fenolnih spojeva prema faktorskom ANOVA testu (Duncanov *post-hoc* test, $p < 0,05$)

Fenolni spoj	Uzorak		BI (%) [*]					
Fenolne kiseline								
Galna kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^C	
	NIE	ε	22,4 ± 0,8	jk	108,8 ± 4,9	ef	47,4 ± 0,3	hi
	NA _{IG}	β	142,0 ± 7,6	c	130,9 ± 1,8	cd	64,6 ± 4,3	h
	NA-GA _{IG}	γ	121,4 ± 3,8	de	31,4 ± 2,9	ij	133,9 ± 11,2	cd
	NA-ŽEL _{IG}	α	310,4 ± 16,5	b	331,2 ± 19,5	a	95,7 ± 1,8	fg
	NA(1.5KZ) _{IG}	δ	83,2 ± 1,0	g	122,1 ± 11,5	de	9,2 ± 0,6	k

Fenolni spoj	Uzorak		BI (%) [*]					
			CS ^B		CF ^A		M ^C	
3,4-Dihidroksi-benzojeva kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^C	
	NIE	δ	18,3 ± 0,6	h	70,6 ± 0,4	fg	12,3 ± 0,2	h
	NA _{IG}	γ	42,7 ± 12,0	gh	231,9 ± 0,3	c	40,8 ± 3,0	gh
	NA-GA _{IG}	γ	109,6 ± 1,5	de	130,7 ± 26,8	d	31,7 ± 0,5	h
	NA-ŽEL _{IG}	α	112,7 ± 52,7	de	708,6 ± 10,0	a	101,6 ± 8,9	def
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	84,6 ± 3,5	ef	305,2 ± 0,8	b	20,0 ± 0,4	h
Vanilinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
	NIE	γ	22,9 ± 1,1	e	29,6 ± 0,0	e	22,1 ± 0,7	e
	NA _{IG}	β	39,2 ± 1,9	d	22,5 ± 1,4	e	42,8 ± 3,3	d
	NA-GA _{IG}	α	78,4 ± 3,0	b	29,6 ± 4,1	e	65,6 ± 1,4	c
	NA-ŽEL _{IG}	β	92,7 ± 13,9	a	0,0	f	0,0	f
	NA(1,5KZ) _{IG}	δ	40,2 ± 0,0	d	0,0	f	0,0	f
Elaginska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^C		CF ^B		M ^A	
	NIE	δ	1,7 ± 0,1	hi	1,6 ± 0,0	hi	15,5 ± 0,5	c
	NA _{IG}	α	5,9 ± 0,5	fg	9,3 ± 0,6	de	47,1 ± 3,3	a
	NA-GA _{IG}	γ	10,1 ± 0,4	de	3,3 ± 0,1	gh	16,7 ± 1,6	c
	NA-ŽEL _{IG}	β	9,0 ± 3,2	de	31,9 ± 1,1	b	16,2 ± 0,9	c
	NA(1,5KZ) _{IG}	δ	7,2 ± 0,1	ef	10,4 ± 1,1	d	0,0	i
o-Kumarinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
	NIE	δ	78,7 ± 12,4	i	48,1 ± 0,3	i	61,7 ± 0,6	i
	NA _{IG}	β	601,2 ± 44,7	fg	509,5 ± 21,4	fg	1069,8 ± 158,5	d
	NA-GA _{IG}	β	735,9 ± 8,4	e	167,4 ± 0,0	i	1195,9 ± 70,8	c
	NA-ŽEL _{IG}	α	1444,3 ± 117,2	b	1009,9 ± 8,5	d	2024,1 ± 26,5	a
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	494,2 ± 0,0	g	627,4 ± 40,3	ef	312,7 ± 2,8	h
p-Kumarinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
	NIE	α	87,0 ± 3,3	b	272,8 ± 49,0	a	65,4 ± 2,5	b
	NA _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-GA _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-ŽEL _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
Flavanoli								
Epikatehin	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
	NIE	ε	49,8 ± 1,1	k	0,0	l	15,6 ± 0,2	l
	NA _{IG}	γ	402,0 ± 13,8	e	116,3 ± 0,6	i	295,2 ± 16,7	f
	NA-GA _{IG}	β	696,7 ± 1,2	b	89,1 ± 1,6	j	278,7 ± 5,0	f
	NA-ŽEL _{IG}	α	749,5 ± 35,9	a	226,0 ± 7,5	g	532,9 ± 3,2	c
	NA(1,5KZ) _{IG}	δ	457,0 ± 7,9	d	143,5 ± 5,4	h	148,6 ± 3,0	h
Katehin	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	δ	0,0	d	0,0	d	0,0	d
	NA _{IG}	δ	0,0	d	0,0	d	0,0	d
	NA-GA _{IG}	β	0,0	d	0,0	d	24,9 ± 4,0	b
	NA-ŽEL _{IG}	α	0,0	d	0,0	d	58,3 ± 4,2	a
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	0,0	d	0,0	d	12,3 ± 0,0	c
Epikatehin galat	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
	NIE	ε	116,8 ± 13,2	i	98,8 ± 0,2	i	88,7 ± 8,8	i
	NA _{IG}	γ	699,1 ± 5,8	f	345,2 ± 18,5	h	814,2 ± 7,4	e
	NA-GA _{IG}	β	1441,3 ± 21,7	c	117,2 ± 11,8	i	999,8 ± 35,6	d
	NA-ŽEL _{IG}	α	1559,1 ± 9,4	b	457,3 ± 20,4	g	2727,5 ± 36,2	a
	NA(1,5KZ) _{IG}	δ	807,4 ± 61,7	e	475,9 ± 18,6	g	370,7 ± 8,9	h
Galokatehin galat	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
	NIE	δ	251,4 ± 10,4	i	150,0 ± 4,7	j	234,0 ± 0,2	i
	NA _{IG}	γ	692,4 ± 3,2	f	379,0 ± 8,2	h	701,1 ± 33,2	f
	NA-GA _{IG}	β	1183,8 ± 19,9	c	416,8 ± 1,9	h	851,0 ± 33,5	d
	NA-ŽEL _{IG}	α	1606,4 ± 56,0	a	748,3 ± 2,0	e	1253,3 ± 2,6	b
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	771,9 ± 5,3	e	398,9 ± 10,5	h	528,2 ± 2,0	g
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b

Fenolni spoj	Uzorak		BI (%) [*]					
Procijanidin B1	NA _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{IG}	α	0,0	b	0,0	b	24,4 ± 1,3	a
	NA-ŽEL _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
Procijanidin B2	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	γ	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA _{IG}	γ	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-GA _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	58,5 ± 0,6	b
	NA-ŽEL _{IG}	α	0,0	c	0,0	c	84,2 ± 2,9	a
	NA(1,5KZ) _{IG}	γ	0,0	c	0,0	c	0,0	c
Flavonoli								
Rutin	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
	NIE	α	0,0	b	29,0 ± 2,8	a	0,0	b
	NA _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-ŽEL _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
Antocijani								
Oenin klorid	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	α	34,4 ± 2,8	b	32,7 ± 2,9	b	62,6 ± 4,5	a
	NA _{IG}	β	0,0	d	0,0	d	0,0	d
	NA-GA _{IG}	β	0,0	d	5,2 ± 0,0	c	0,0	d
	NA-ŽEL _{IG}	β	0,0	d	0,0	d	0,0	d
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	2,9 ± 0,1	dc	0,0	d	0,0	d
Peonidin-3-O-glukozid klorid	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	α	24,7 ± 4,3	b	24,0 ± 2,9	b	42,4 ± 5,9	a
	NA _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-GA _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-ŽEL _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA(1,5KZ) _{IG}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c

* srednje vrijednosti ± SD pojedinih grupa podataka; različita slova (velika, mala te mala slova grčke abecede) označavaju statistički značajno različite skupove podataka za svaki faktor

Tablica 4.26 Statistička značajnost utjecaja omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) na BI pojedinačnih fenolnih spojeva iz NIE i njihovih inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem prema faktorskom ANOVA testu te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Fenolni spoj	Faktor	p	Veličina efekta
Galna kiselina	omotač	0,0000 *	55,1 %
	ekstrakt	0,0000 *	13,6 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	30,8 %
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	omotač	0,0000 *	28,7 %
	ekstrakt	0,0000 *	40,6 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	30,3 %
Fenolne kiseline	omotač	0,0000 *	27,5 %
	ekstrakt	0,0000 *	34,0 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	37,5 %
Elaginska kiselina	omotač	0,0000 *	27,2 %
	ekstrakt	0,0000 *	17,5 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	54,6 %
o-Kumarinska kiselina	omotač	0,0000 *	71,4 %
	ekstrakt	0,0000 *	11,7 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	16,4 %

Flavanoli	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	omotač	0,0000 *	63,9 %
		ekstrakt	0,0000 *	6,9 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	27,6 %
	Epikatehin	omotač	0,0000 *	45,6 %
		ekstrakt	0,0000 *	39,8 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	14,5 %
	Katehin	omotač	0,0000 *	21,9 %
		ekstrakt	0,0000 *	34,0 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	43,7 %
	Epikatehin galat	omotač	0,0000 *	48,8 %
		ekstrakt	0,0000 *	20,4 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	30,7 %
	Galokatehin galat	omotač	0,0000 *	66,2 %
		ekstrakt	0,0000 *	24,5 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	9,2 %
	Procijanidin B1	omotač	0,0000 *	28,5 %
		ekstrakt	0,0000 *	14,3 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	57,1 %
Flavonoli	Rutin	omotač	0,0000 *	23,4 %
		ekstrakt	0,0000 *	29,6 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	46,9 %
Antocijani	Oenin klorid	omotač	0,0000 *	28,4 %
		ekstrakt	0,0000 *	14,2 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	56,9 %
	Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	omotač	0,0000 *	87,8 %
		ekstrakt	0,0000 *	1,7 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	10,2 %

* statistički značajan utjecaj uz $p < 0,05$

Faktorijalni ANOVA test pokazuje da su oba faktora odnosno omotač i ekstrakt imali statistički značajan utjecaj na *BI* vrijednosti pojedinačnih fenolnih spojeva kod inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem te da postoji statistički značajna interakcija između faktora (**Tablica 4.26**). Utjecaj faktora „omotač“ bio je dominantan na varijabilnost *BI* kod 11 pojedinačnih fenolnih spojeva (galna kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, epikatehin, epikatehin galat, galokatehin galat, procijanidini B1, rutin, oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid) s 27,2 – 89,9 % varijance, dok je utjecaj faktora „ekstrakt“ imao najveći utjecaj na varijabilnost *BI* kod 4 fenolna spoja (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, katehin, procijanidini B2) s 29,6 – 40,6 % varijance. Općenito, kod većine fenolnih spojeva inkapsulacija ionskim geliranjem uz primjenu ispitivanih omotača dovela je do povećanja biodostupnosti u odnosu na NIE. Izuzetak su *p*-kumarinska kiselina, rutin, oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid gdje inkapsulacija nije doprinijela povećanju njihove biodostupnosti (**Tablica 4.25**). Nadalje, kod svih onih fenolnih spojeva kod kojih je inkapsulacija poboljšala njihovu biodostupnost kao najučinkovitiji omotač ističe se NA-ŽEL_{IG}

osim kod vanilinske kiseline, elaginske kiseline i procijanidina B1. U pogledu ekstrakata niti jedan ekstrakt nije bio dominantan u pogledu najveće biodostupnosti svih fenolnih spojeva. Navedeno je u skladu s dokazanim statistički značajnim utjecajem interakcije omotača i ekstrakta koji je s 7,1 – 57,1 % varijance utjecao na varijabilnost *BI* podataka (**Tablice 4.25 i 4.26**).

Fenolne kiseline kvantificirane u IP fazi probave NIE i/ili svih inkapsulata bile su galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska, elaginska, *o*-kumarinska, *p*-kumarinska. Galna kiselina otpuštala se u svim fazama probave iz svih NIE uzorka s najvišim koncentracijama određenim u IP fazi na osnovi čega su izračunate njezine *BI* vrijednosti u rasponu 22,4 – 108,8 %. Isto tako bez obzira na korišteni omotač i ekstrakt ova kiselina se otpuštala iz inkapsulata tijekom svih faza probave dosežući najveće koncentracije u IP fazi probave. Izuzetak su bili M-NA-GA_{IG}, M-NA-ŽEL_{IG} i M-(1,5KZ)_{IG}, kod kojih nije dokazana galna kiselina u OP i GP fazi. Kod galne kiseline inkapsulacija je u većini slučajeva doprinijela povećanju *BI*, a *BI* vrijednosti bile su veće za 1,2 – 6,3 puta kod NA_{IG} inkapsulata, 1,4 – 5,4 puta kod NA-GA_{IG} inkapsulata, 2,0 – 13,9 puta kod NA-ŽEL_{IG} inkapsulata te 1,1 – 3,7 puta kod NA(1,5KZ)_{IG} u odnosu na NIE.. Najveći *BI* galne kiseline je određen kod CF-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata (331,2 %). Ukoliko *BI* fenolnog spoja iznosi preko 100 % to ukazuje na razgradnju kompleksnijih fenolnih spojeva tijekom simulirane probave pri čemu su koncentracije određenog spoja više nego li prije probave. Prema pretpostavkama drugih autora (Olivas-Aguirre i sur., 2016; Goszcz i sur., 2017) postoji mogućnost da je porast koncentracije galne kiseline tijekom IP faze rezultat razgradnje antocijana oenin klorida i mirtilin klorida. Otpuštanje 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline iz NIE i iz svih CS, CF i M inkapsulata odvijalo se samo u IP fazi probave. *BI* ove kiseline za sve NIE kretao se u rasponu 12,3 – 70,6 % dok je inkapsulacija utjecala na povećanje biodostupnosti 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline bez obzira na primijenjeni omotač i ekstrakt te su *BI* vrijednosti bile veće za 2,3 – 3,3 puta za NA_{IG} inkapsulate; 1,9 – 6,0 puta za NA-GA_{IG} inkapsulate; 6,2 – 10,0 puta za NA-ŽEL_{IG} inkapsulate i 1,6 – 4,6 puta za NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulate. Najveći *BI* određen je kod CF-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata (708,6 %). Vanilinska kiselina, slično 3,4-dihidroksibenzojevoj kiselini, identificirana je i kvantificirana samo u otopini IP faze za sve NIE i sve CS inkapsulate dok kod NA-ŽEL_{IG} i NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata koji sadrže CF i M ekstrakte nije detektirana ova kiselina u crijevnoj fazi i stoga joj nije bilo moguće odrediti niti *BI* za ove uzorke (**Tablice 4.3 i 4.25, Tablice P1.1 – P1.3**). Probavom NIE postignut je *BI* vanilinske kiseline u rasponu od 22,1 do 29,6 %, a inkapsulacijom pomoću NA_{IG} je postignut je veći *BI* za 1,7 do 1,9 puta te

pomoću omotača NA-GA_{IG} veći *BI* za 3,0 – 3,4 put u odnosu na NIE. Nakon probave CS-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata *BI* vanilinske kiseline bio je za 4,0 puta veći u odnosu na *BI* vrijednost NIE, a nakon probave CS-NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata za 1,8 puta veći u odnosu na NIE. CF inkapsulati nisu doprinijeli povećanju *BI* vanilinske kiseline. Ukoliko se promatraju svi inkapsulati, najveći *BI* vanilinske kiseline postignut je nakon probave CS-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata a iznosio je 92,7 %. Budući da se vanilinska i 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina pojavljuju tek u IP fazi probave može se pretpostaviti da nastaju kao produkt razgradnje antocijana prisutnih u ekstraktima (Olivas-Aguirre i sur., 2016). Također, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina može nastati kao produkt razgradnje vanilinske kiseline koja pak potječe od razgradnje ferulinske kiseline (Calani i sur., 2014) koja je detektirana i kvantificirana u početnim NIE uzorcima. Siringinska kiselina identificirana je i kvantificirana u OP i/ili GP tijekom simulirane probave NIE uzoraka. U slučaju svih ispitivanih inkapsulata, siringinska kiselina nije detektirana u IP fazi, stoga *BI* ove fenolne kiseline nije bilo moguće izračunati iako je za neke inkapsulate (CS-NA(1,5KZ)_{IG}, CF-NA_{IG}, CF-NA-ŽEL_{IG} i CF-NA(1,5KZ)_{IG}) zabilježeno otpuštanje u ranijim fazama probave (Tablice 4.3 i 4.25, Tablice P1.1 – P1.3). Otpuštena elaginska kiselina iz svih NIE uzorka detektirana je samo u IP fazi dok je profil otpuštanja ove kiseline iz inkapsulata varirao kroz sve faze ovisno o ekstraktu i omotaču. *BI* vrijednosti NIE bile su niske i kretale su se u rasponu od 1,6 % do 15,5 %. Generalno, inkapsulacija je utjecala na povećanje *BI* elaginske kiseline u odnosu na NIE te su *BI* vrijednosti bile 3,0 – 5,8 puta veće za NA_{IG} inkapsulate; 1,1 – 5,9 puta veće za NA-GA_{IG} inkapsulate; 5,3 – 19,9 puta veće za NA-ŽEL_{IG} inkapsulate te 4,2 – 6,5 puta veće za NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulate, dok je općenito najveća biodostupnost (*BI* = 47,1 %) određena kod M-NA_{IG} inkapsulata. Izuzetak su bili M-NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata kod kojih nije bilo moguće odrediti *BI* jer ova kiselina nije detektirana u IP fazi. *o*-kumarinska kiselina se iz svih NIE uzorka otpuštala isključivo u IP fazi probave, a *BI* ove fenolne kiseline kretao se u rasponu od 48,1 % do 78,7 %. Kod svih inkapsulata *o*-kumarinska kiselina nije detektirana u OP, nego je kod većine inkapsulata detektirana tek od GP faze i u IP fazi, uz iznimke za CF-NA-GA_{IG} inkapsulate i M-NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulate kod kojih je otpuštanje *o*-kumarinske kiseline uočeno samo u IP fazi. U pogledu *BI* vrijednosti, inkapsulacija je dovela do povećanja *BI* vrijednosti *o*-kumarinske kiseline u odnosu na NIE (7,6 – 17,3 puta veća *BI* kod NA_{IG} inkapsulata; 3,5 – 19,4 puta veća *BI* kod NA-GA_{IG} inkapsulata; 18,4 – 32,8 puta veća *BI* kod NA-ŽEL_{IG} inkapsulata te 4,2 – 6,5 puta veća *BI* kod NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata) pri čemu su najveće *BI* vrijednosti (2024,1 %) dobivene nakon simulirane probave M-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata. Što se tiče *p*-kumarinske kiseline, ona se otpuštala samo iz NIE tijekom *in vitro* simulirane probave kroz sve faze, a najveće koncentracije određene su u IP fazi, te je najveći

BI (272,8 %) imao je uzorak CF-NIE. *p*-Hidroksibenzojeva, kafeinska i ferulinska kiselina kvantificirane su samo u NIE uzorcima prije probave te nije bilo moguće izračunati *BI* ovih spojeva (Tablice 4.3 i 4.25, Tablice P1.1 – P1.3).

Flavanoli epikatehin, katehin, epikatehin galat, galokatehin galat te procijanidin B1 i B2 kvantificirani su tijekom simulirane probave NIE i inkapsulata, ovisno o uzorku. Trend otpuštanja epikatehina tijekom faza simulirane probave NIE se razlikovao s obzirom na ispitivani ekstrakt, a *BI* epikatehina uspješno je određen nakon simulirane probave NIE-CS (49,8 %) i NIE-M (15,6 %) dok ga kod CF nije bilo moguće odrediti budući da nije detektiran u IP fazi. Otpuštanje epikatehina iz svih CF i M inkapsulata te CS-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata odvijalo se kroz sve faze simulirane probave, a u najvećim koncentracijama određen je u probavnoj otopini IP faze dok se epikatehin iz ostalih CS inkapsulata otpuštao samo u IP fazi probave. U probavnoj otopini IP faze, koncentracije epikatehina za većinu inkapsulata (osim za CF-NA-GA_{IG} inkapsulata) bile su veće od početnih koncentracija prije probave što je rezultiralo s *BI* vrijednostima većim od 100 %. Općenito inkapsulacija je povećala biodostupnost epikatehina u odnosu na NIE za 8,1 – 18,9 puta kod NA_{IG} inkapsulata; 14,0 – 17,9 puta kod NA-GA_{IG} inkapsulata, 15,1 – 34,2 puta NA-ŽEL_{IG} inkapsulata te 9,2 – 9,5 puta NA-(1,5KZ)_{IG}, a najveći *BI* (749,5 %) je određen kod CS-NA-ŽEL_{IG}. Povećanje koncentracije epikatehina može se objasniti razgradnjom procijanidina B2, koji je polimer jedinica epikatehina, tijekom GP faze (Bouayed i sur., 2012), te se može pretpostaviti da je to također utjecalo na više vrijednosti *BI* od 100 %. Katehin je tijekom simulirane probave svih NIE identificiran i kvantificiran samo u OP i GP fazi dok s druge strane nije uočen uniforman trend otpuštanja katehina iz svih inkapsulata. Naime, iz CS-NA_{IG} i CS-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata vidljivo je otpuštanje katehina isključivo u OP, a iz ostalih CS inkapsulata katehin nije detektiran tijekom cijele probave. Nadalje, katehin je identificiran i kvantificiran u OP i GP fazi većine CF inkapsulata, izuzev CF-NA-GA_{IG} inkapsulata tijekom čije je probave detektiran samo u OP fazi. Iz M-NA_{IG} inkapsulata katehin se otpuštao isključivo tijekom OP i GP, a iz M-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata samo tijekom IP faze. Nadalje, otpuštanje katehina uočeno je tijekom svih faza probave iz M-NA-GA_{IG} inkapsulata te tijekom OP i GP iz M-NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata. S obzirom na navedeno, *BI* vrijednosti je jedino bilo moguće izračunati za M-NA-GA_{IG}, M-NA-ŽEL_{IG}, M-NA(1,5KZ)_{IG} koje su iznosile 24,9 %, 58,3 %, odnosno 12,3 %. Epikatehin galat tijekom simulirane probave CS-NIE uzorka detektiran je u OP i IP fazi, a kod ostalih NIE uzoraka samo u IP. Ovaj flavanol je iz inkapsulata uglavnom, ovisno o ekstraktu, detektiran u GP i IP fazama uz iznimku za CF-NA_{IG} gdje je detektiran i u OP fazi. Primijećeno je i da su u otopini GP faze kod većine inkapsulata određene veće koncentracije epikatehin galata nego u

NIE prije probave (**Tablica 4.3**), a iznimka su CF-NA-GA_{IG} inkapsulati kod kojih je veća koncentracija određena tek u IP fazi. Inkapsulacija je poboljšala biodostupnost ovog flavanola i to 3,5 - 9,2 puta kod NA_{IG} inkapsulata; 1,2 – 12,3 puta kod NA-GA_{IG} inkapsulata; 4,6 – 30,7 puta kod NA-ŽEL_{IG} inkapsulata i 4,2 – 6,9 puta kod NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata u odnosu na NIE uzorke čiji se *BI* kretao u rasponu od 88,7 % do 116,8 %. Najveći *BI* za epikatehin galat određen je kod M-NA-ŽEL_{IG} (2727,5 %). Galokatehin galat se otpuštao tijekom probave kroz sve tri faze iz M-NIE dok je kod uzorka CS-NIE i CF-NIE kvantificiran samo u IP fazi probave. Trend otpuštanja galokatehin galata bio je sličan kod većine inkapsulata uz nekoliko iznimki. Naime, u OP i GP uočeno je otpuštanje galokatehin galata iz CFE-NA(1,5KZ)_{IG} inkapsulata te u OP fazi iz ME-NA_{IG} inkapsulata, dok se iz preostalih inkapsulata galokatehin galat otpuštao isključivo u IP fazi. Inkapsulacija je imala pozitivan utjecaj na *BI* galokatehin galata te je uočeno povećanje vrijednosti s obzirom na NIE za 2,5 – 3,0 puta kod NA_{IG} inkapsulata, 2,8 – 3,6 puta kod NA-GA_{IG} inkapsulata, 5,0 – 6,4 puta kod NA-ŽEL_{IG} inkapsulata te 2,3 – 3,1 puta kod NA-(1,5KZ)_{IG}, a najveći *BI* (1606,4 %) je određen kod CS-NA-ŽEL_{IG}. Procijanidin B1 je kod svih NIE identificiran i kvantificiran samo u ranijim fazama probave odnosno u OP i GP ovisno o ekstraktu. Samo je kod M-NA-GA_{IG} inkapsulata procijanidin B1 detektiran u IP fazi što je omogućilo određivanje *BI* koji je iznosio 24,4 %, dok je kod ostalih inkapsulata ovaj flavanol detektiran samo u ranijim fazama probave kao i NIE. Procijanidin B2 identificiran je i kvantificiran u otopinama OP i GP faze tijekom probave svih NIE te nije bilo moguće odrediti njegov *BI*. Prilikom simulirane probave inkapsulata uočeno je otpuštanje procijanidina B2 u svim fazama probave samo iz M-NA-GA_{IG} i M-NA-ŽEL_{IG} inkapsulata dok se kod ostalih inkapsulata otpuštanje odvijalo samo u ranijim fazama probave. Stoga je *BI* određen samo za navedene inkapsulate i iznosio je iznosio 58,5 % za M-NA-GA_{IG} i 84,2 % za M-NA-ŽEL_{IG} inkapsulate. Ovi procijanidini su također poznati i kao kondenzirani tanini i u svojoj strukturi sadrže jednostavnije flavanole kao što su katehin i epikatehin. U kiselom mediju podložni su razgradnji te se u otopini OP faze često depolimeriziraju u katehin i epikatehin, a zatim se depolimerizacija može nastaviti i u fazi tankog crijeva (Niwano i sur., 2022) (**Tablice 4.3 i 4.25, Tablice P1.1 – P1.3**).

Flavonol rutin se otpuštao kroz tri faze samo iz CF-NIE te mu je *BI* iznosio 29 %, dok se iz drugih NIE otpuštao u ranijim fazama probave. U slučaju inkapsulata nije zabilježeno otpuštanje rutina. Flavanoli kvecetin i kemferol bili su prisutni u NIE prije probave dok je nakon probave samo kvercetin detektiran u ranijim fazama probave NIE uzoraka. Rezultati pokazuju da inkapsulacija ispitanim omotačima nije imala pozitivan utjecaj na *BI* flavanola. (**Tablice 4.3 i 4.25, Tablice P1.1 – P1.3**).

Stilbeni resveratrol i ϵ -viniferin kvantificirani su samo prije probave u NIE dok nakon *in vitro* simulirane probave nisu detektirani niti u NIE niti u inkapsulatima te *BI* indeks nije bilo moguće izračunati (**Tablice 4.3 i 4.25, Tablice P1.1 – P1.3**).

Antocijani koji su detektirani u svim fazama probave NIE uzoraka bili su oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid dok su mirtilin klorid (uz izuzetak kod M-NIE gdje nije detektiran ovaj spoj niti u jednoj fazi probave) i petunidin klorid kvantificirani samo u ranijim fazama probave (OP i/ili GP) pa za njih nije bilo moguće izračunati *BI*. Kuromanin klorid detektiran je u svim NIE prije probave, dok je kalistefin klorid detektirani samo u CF-NIE prije probave. Kod antocijana koji nisu detektirani tijekom probave uzrok može biti njihova niska početna koncentracija. Antocijani su u vodi topive protonirane molekule koje su osjetljive na promjene pH vrijednosti i zbog toga podliježu brojnim promjenama tijekom probave (Braga i sur., 2018). Kamonpatana i sur. (2012; 2014) dokazali su da blago lužnati pH sline može imati utjecaj na antocijane i da reakcije biotransformacija antocijana započinju već u usnoj šupljini što je vidljivo i iz dobivenih rezultata. Prelaskom iz OP u GP fazu pH se mijenja iz 7 u 1,5 – 3,5 što je optimalan pH vrijednost za održavanje prirodnog strukturnog oblika antocijana (Castañeda-Ovando i sur., 2009) te su upravo u GP fazi otpuštene najveće koncentracije oenin klorida i peonidin-3-*O*-glukozid klorida iz svih NIE i petunidin klorida iz CF-NIE. U IP uslijed neutralnog pH dolazi do razgradnje antocijana u molekule manje molekularne mase poput fenolnih kiselina (Braga i sur., 2018). Iz navedenog, izračunat je *BI* za sve NIE u rasponu od 32,7 % do 62,6 % za oenin klorid i u rasponu od 24,0 do 42,4 % za peonidin-3-*O*-glukozid klorid.

Sveukupno, bez obzira na primijenjeni ekstrakt i omotač inkapsulacija je u većini slučajeva pridonijela povećanju biodostupnosti pojedinačnih fenolnih spojeva. NA_{IG} inkapsulati rezultirali s *BI* vrijednostima većim za 1,2 – 10,6 puta u odnosu na NIE, $NA-GA_{IG}$ inkapsulati za 1,1 – 19,4 puta, $NA-\check{Z}EL_{IG}$ inkapsulati za 2,0 – 34,2 puta većim *BI* te $NA (1,5 KZ)_{IG}$ 1,1 – 13,0 puta većim vrijednostima u odnosu na NIE. Najveće vrijednosti *BI* nakon simulacije probave inkapsulata određene su za galokatehin galat, *o*-kumarinsku kiselinu i epikatehin galat.

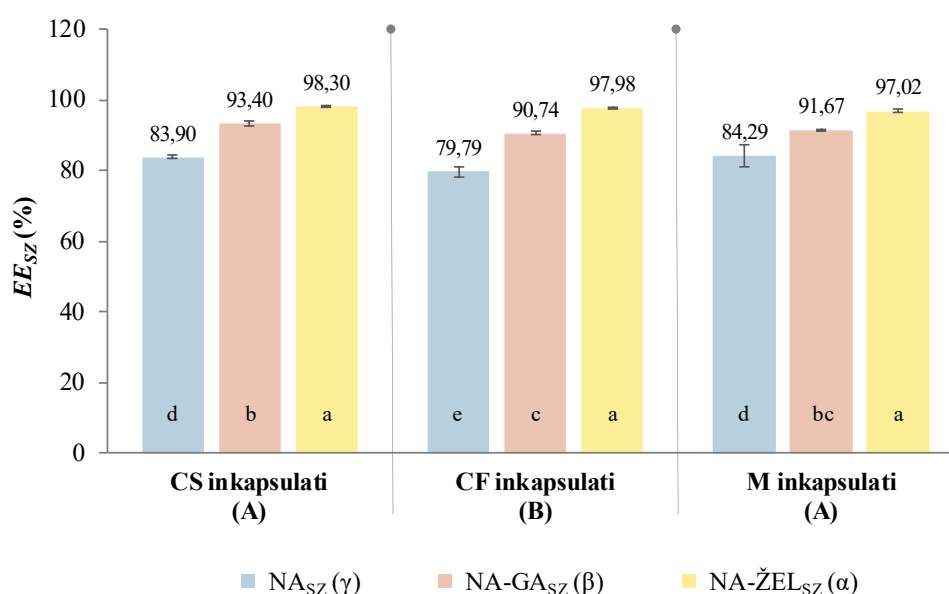
4.5. INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA METODOM SUŠENJA ZAMRZAVANJEM

Ekstrakti tropa grožđa CS, CF i M inkapsulirani su metodom sušenja zamrzavanjem pomoću tri odabrana omotača (NA_{sz} , $NA-GA_{sz}$, $NA-\check{Z}EL_{sz}$). Određena je učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva ekstrakata tropa grožđa ovom metodom (EE_{sz}) prema **izrazu (3.27)** te procijenjen utjecaj ekstrakta i omotača na svojstva dobivenih inkapsulata poput morfologije i

amorfности, odnosno kristaličnosti. Nadalje, procijenjen je udio otpuštenih fenolnih spojeva iz inkapsulata u pojedinim fazama probave tijekom *in vitro* simulirane probave bez prisustva enzima te indeks biodostupnosti fenolnih spojeva iz NIE i inkapsulata nakon simulirane probave uz prisustvo enzima.

4.5.1. Učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva sušenjem zamrzavanjem za različite inkapsulate - utjecaj omotača i ekstrakta

Podaci za EE_{SZ} ekstrakata CS, CF i M bogatih fenolnim tvarima kao i statistička analiza utjecaja omotača i ekstrakta na EE_{SZ} prikazani su na Slici 4.21. i u Tablici 4.27.



Slika 4.21 Učinkovitost inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem (EE_{SZ} , %) ekstrakata tropa grožđa bogatih fenolnim spojevima (CS, CF i M inkapsulati) pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ} i NA-ŽEL_{SZ}). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$.

Tablica 4.27 Faktorski ANOVA test za EE_{SZ} - značajnost utjecaja omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije metodom sušenje zamrzavanjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Ekstrakt	25,7	2	12,9	9,2	0,0018 *	2,3 %
Omotač	1045,4	2	522,7	373,3	0,0000 *	93,2 %
Ekstrakt × omotač	25,2	4	6,3	4,5	0,0108 *	2,2 %
Pogreška	25,2	18	1,4			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

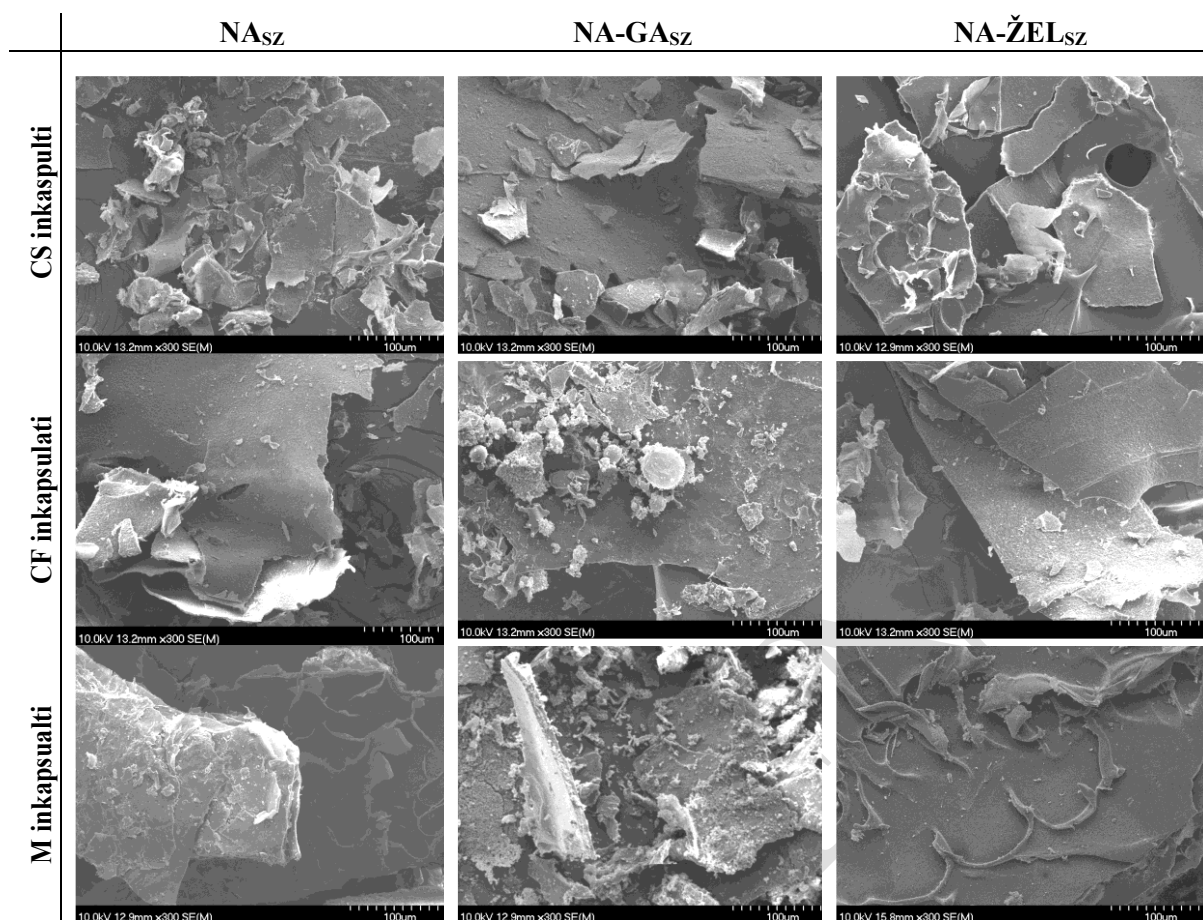
Rezultati pokazuju da je ostvarena bolja EE_{SZ} kada je natrij alginatu dodavan dodatni omotač kod svih ispitivanih inkapsulata odnosno te su vrijednosti za EE_{SZ} iznosile 79,79 – 84,29 % za sve NA_{SZ} inkapsulate, 90,74 – 93,40 % za $NA-GA_{SZ}$ inkapsulate te 97,02 – 98,30 % za $NA-ŽEL_{SZ}$ inkapsulate. Statistička analiza je, prema faktorskom ANOVA testu, pokazala da su oba faktora (ekstrakt i omotač) imala su statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na EE_{SZ} te da postoji statistički značajna interakcija između njih. Pri tome je 93,2 % varijance svih podataka posljedica varijabilnosti faktora „omotač“, pri čemu je najveći utjecaj na EE_{SZ} imao omotač $NA-ŽEL_{SZ}$, a najmanji NA_{SZ} . Varijabilnost faktora „ekstrakt“ uzrokovalo je samo 2,3 % varijance, pri čemu je vidljivo da se EE_{SZ} za CF inkapsulate statistički značajno razlikovao od EE_{SZ} za CS i M inkapsulate. Interakcija između utjecaja ekstrakta i omotača utjecala je na varijancu s 2,2 % (**Slika 4.21, Tablica 4.27**).

Analogno ionskom geliranju, može se pretpostaviti da poboljšanje EE_{SZ} pri upotrebi dodatnih omotača proizlazi iz njihovih specifičnih karakteristika i mogućnosti interakcije s fenolnim spojevima ekstrakata tropa grožđa. Konkretno, upotreba GA ili ŽEL tijekom inkapsulacije značajno povećava EE zbog njihovog sadržaja proteina, koji potiče stvaranje hidrofobnih i vodikovih veza s fenolnim spojevima sadržanim u ekstraktima tropa grožđa. Ove interakcije su dodatno pojačane sposobnošću proteina da se veže sa slobodnim karboksilnim skupinama ovih polimera (Li i sur., 2009; Jyothi i sur., 2010).

Dobiveni rezultati u skladu su s postojećom literaturom (Fang i Bhandari, 2012) koja ističe utjecaj omotača na ishod inkapsulacije te ukazuju na sinergistički učinak kombiniranja NA-GA ili NA-ŽEL omotača, što dovodi do veće EE . Osim toga, svojstva emulgiranja i geliranja kod GA (Mariod, 2018) te sposobnost ŽEL da poboljša mehaničku čvrstoću i svojstva zaštite od okolišnih utjecaja (Tyuftin i Kerry, 2021) također doprinose poboljšanju EE osiguravanjem učinkovitijeg procesa inkapsulacije i smanjenjem gubitka fenolnih spojeva tijekom sušenja zamrzavanjem. Ovi rezultati upućuju na to da je postizanje optimalne EE ključno za očuvanje stabilnosti bioaktivnih spojeva tijekom procesa sušenja zamrzavanjem te za njihovu učinkovitu primjenu u formulacijama hrane i dodataka prehrani.

4.5.2. Morfologija različitih inkapsulata dobivenih metodom sušenja zamrzavanjem

Analizirana je morfologija različitih CS, CF i M inkapsulata, pripremljenih s različitim omotačima (NA_{SZ} , $NA-GA_{SZ}$, $NA-ŽEL_{SZ}$) pomoću inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem, pomoću SEM-a, a dobivene slike su prikazane na **Slici 4.22**.

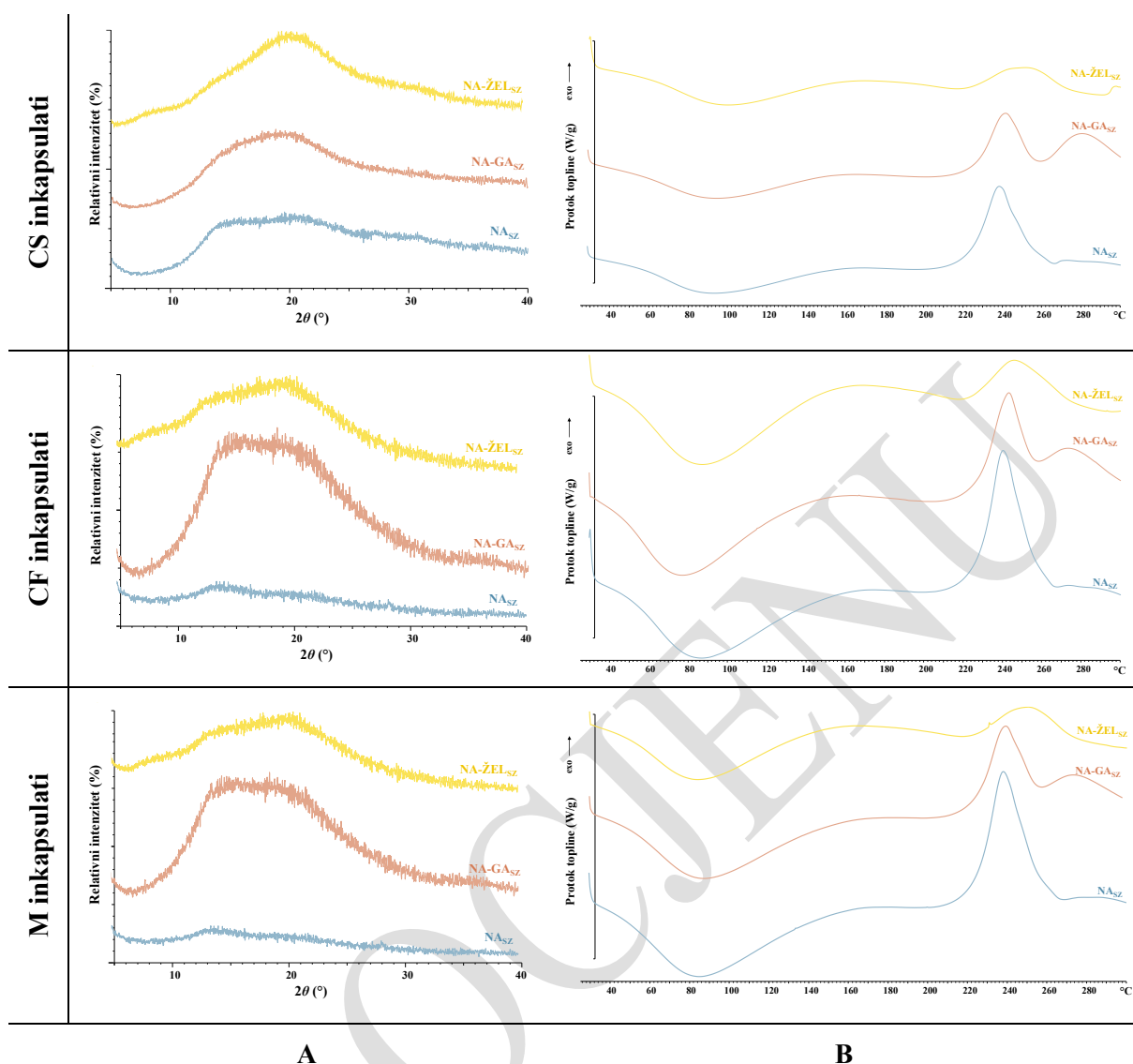


Slika 4.22 SEM slike (povećanje 300 x) CS, CF i M inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ})

Inkapsulati dobiveni postupkom inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem pokazuju površinsku morfologiju koja je karakterizirana ispucanim, pločastim izgledom te teksturom koja podsjeća na piljevinu (**Slici 4.22**) što je u skladu s istraživanjima drugih autora u području inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem (Ballesteros i sur., 2017; Ravichai i Muangrat, 2019). Osim ovih karakteristika, inkapsulati su također pokazali područja glatkih površina, pridonoseći tako raznolikom morfološkom profilu. Takve fizikalne karakteristike ukazuju na visok stupanj krhkosti, što omogućuje njihovo lako razbijanje na manje čestice (Zuidam i Shimoni, 2002). Ova lomljivost je ključni čimbenik za rukovanje, skladištenje i mogućnosti primjene praškastih materijala u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te biotehnologiji, budući da može utjecati na topljivost, bioraspoloživost i mehanizme otpuštanja inkapsuliranih spojeva.

4.5.3. Termofizikalna analiza različitih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem

XRPD i DSC analize su provedene s ciljem ispitivanja svojstva kristaličnosti, odnosno amorfnosti CS, CF i M inkapsulata (**Slika 4.23 A i B**).



Slika 4.23 XRPD difraktogrami (A) i DSC termogrami (B) CS, CF i M inkapsulata pripremljenih inkapsulacijom sušenjem zamrzavanjem pomoću omotača: NAsz, NA-GAsz, NA-ŽELsz

Vidljivo je da su NAsz, NA-GAsz i NA-ŽELsz inkapsulati amorfne strukture, što se očitavalo odsutnošću oštih difrakcijskih vrhova (**Slika 4.23 A**) kao što je to bilo i u slučaju korištenih omotača (**Slika 4.13 A**). S druge strane, korišteni ekstrakti pokazivali su jasno definirane oštre vrhove u XRPD spektru, što sugerira njihovu kristalnu strukturu (**Slika 4.14 A**).

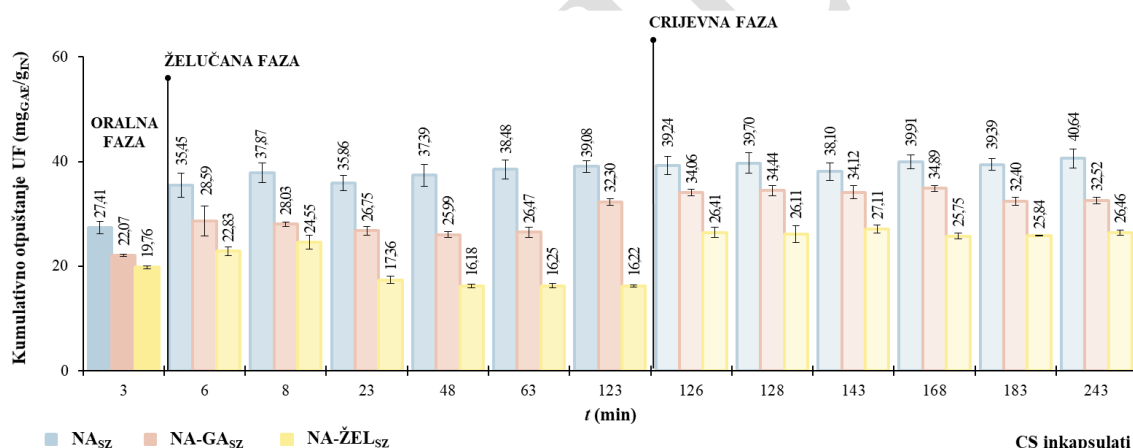
Rezultati upućuju na činjenicu da sušenje zamrzavanjem kao metoda inkapsulacije potiče promjenu kristalne strukture ekstrakata u amorfnu strukturu inkapsulata. Ova transformacija u amorfno stanje tijekom inkapsulacije metodom sušenja zamrzavanjem potvrđena je u nizu istraživanja i naglašava njezinu važnost u poboljšanju topljivosti i bioraspoloživosti aktivnih tvari ekstrakata kao i inkapsuliranih aktivnih spojeva (Tao i sur., 2017; Papoutsis i sur., 2018).

XRPD rezultati dodatno su potkrijepljeni DSC analizom. DSC termogrami pokazuju široke vrhove kako u čistim omotačima (**Slika 4.13 B**) tako i u inkapsulatima (**Slika 4.23 B**), što

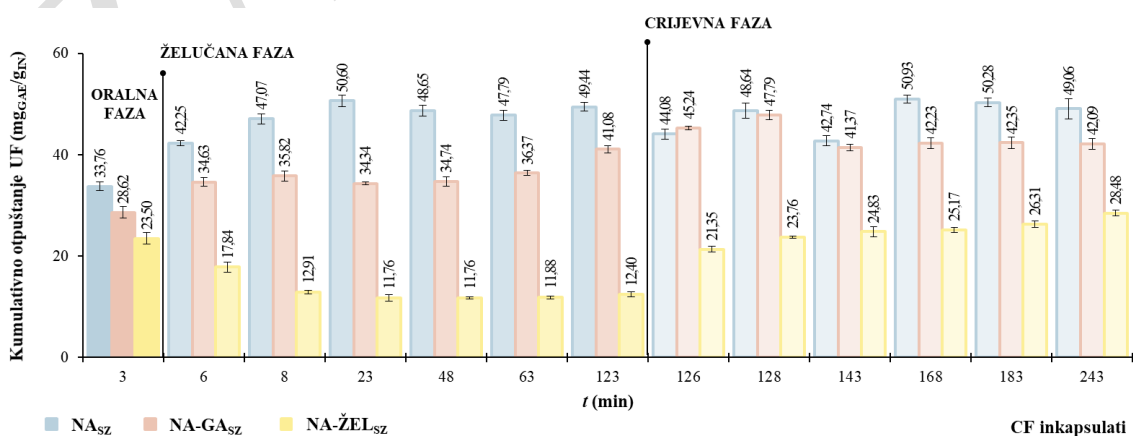
ukazuje na gubitak vode tijekom toplinske analize. Ovo je karakteristična pojava prisutna kod materijala s amorfnom ili polukristalnom strukturom, kod kojih se ovakvi široki vrhovi povezuju sa isparavanjem slobodne vode iz uzorka (Archana i sur., 2013; Arab i sur., 2021). Nasuprot tome, ekstrakti su pokazali jasne i oštre endotermne vrhove (Slika 4.14 B). Ovi oštri prijelazi karakteristični su za točku taljenja kristalnih ekstrakata pri temperaturama od 268,83 do 269,67 °C ovisno o ekstraktu.

4.5.4. Profil i kinetika otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem

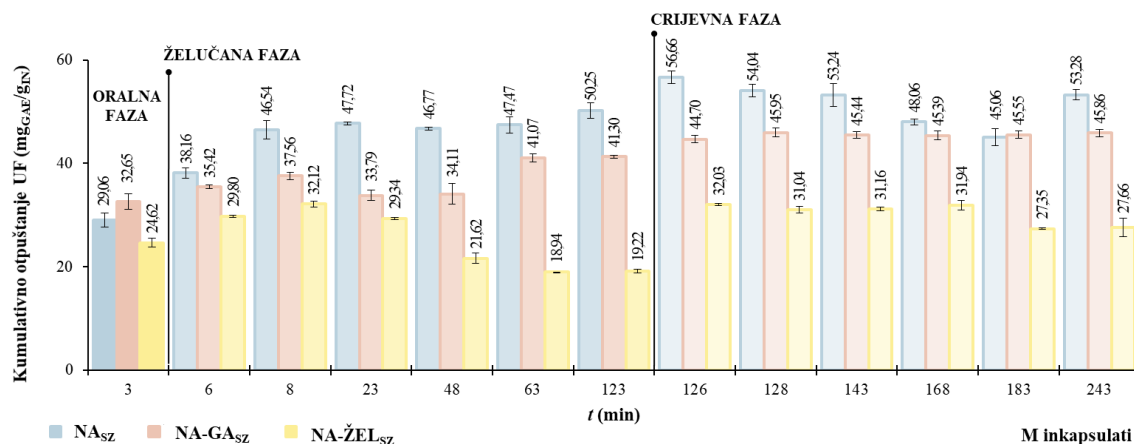
Profil kumulativnog otpuštanja UF-a iz CS, CF i M inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem pomoću omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) praćen je kroz tri faze simulirane probave (OP, GP i IP) bez prisustva enzima u ukupnom trajanju 243 minute, a rezultati su prikazani na Slici 4.24 A-C. Udio otpuštenih UF-a u svakoj fazi probave od ukupno otpuštenih UF-a nakon kompletne probave prikazan je Slikom 4.25.



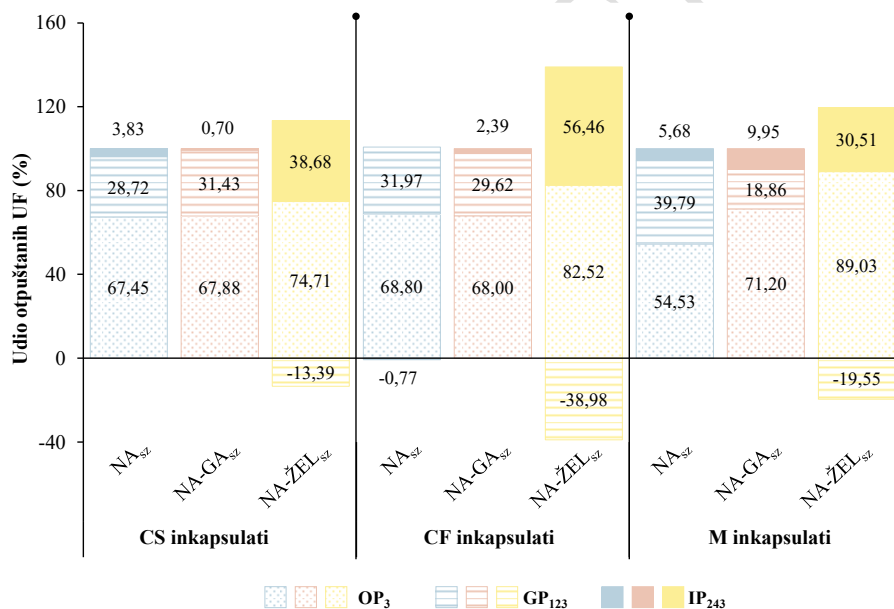
A



B



C
Slika 4.24 Kumulativno otpuštanje UF-a iz CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata (IN u indeksu mjerne jedinice) dobivenih inkapsulacijom sušenjem zamrzavanjem (SZ u indeksu) pomoću omotača NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}



Slika 4.25 Udio otpuštenih UF-a iz CS, CF i M inkapsulata dobivenih inkapsulacijom sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) na kraju svake gastrointestinalne faze: OP₃ – oralne faze, GP₁₂₃ – želučane faze, IP₂₄₃ – crijevne faze (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave)

Profil kumulativnog otpuštanja UF-a iz svih NA_{SZ} inkapsulata pokazuje postupni porast masenog udjela UF od početka OP (27,41 – 33,76 mg_{GAE}/g_{IN}) do kraja GP (39,08 – 50,25 mg_{GAE}/g_{IN}) te s neznatnim porastom masenog udjela UF-a u IP fazi (40,64 – 53,28 mg_{GAE}/g_{IN}) u odnosu na GP (izuzetak su CF-NA_{SZ} inkapsulati). Isto tako tijekom cijele GP i IP nije uočen jasan trend porasta ili pada masenog udjela UF-a iz ovih inkapsulata već su vidljive oscilacije UF-a (**Slika 4.24 A – C**). Svi inkapsulati pripremljeni s NA_{SZ} pokazali su stabilno otpuštanje u

OP fazi (54,53 – 68,80 %) i GP fazi (28,72 – 39,79 %), s ograničenim otpuštanjem u IP (3,83–5,68 %) (**Slika 4.25**), što ukazuje na to da on nije idealan omotač kada se želi postići otpuštenje UF-a u crijevima odnosno na ciljanom mjestu apsorpcije. Nadalje, vidljive su negativne vrijednosti za udio otpuštenih UF-a u IP kod CF-NA_{sz} inkapsulata (-0,77 %) (**Slika 4.25**) što je posljedica otpuštanja većih koncentracija UF-a na kraju GP nego na kraju IP kao što se može uočiti na **Slici 4.24 B**.

NA-GA_{sz} inkapsulati sa CS i CF ekstraktima pokazuju relativno ujednačen profil kumulativnog otpuštanja UF-a. Nakon OP, u GP se uočava jednoliko otpuštanje bez velikih razlika u koncentracijama UF-a, a zatim na kraju GP dolazi do povećanja otpuštanja (32,30 – 41,08 mg_{GAE}/g_{IN}). Prelaskom u IP dolazi do daljnjeg povećanja kumulativnog otpuštanja UF-a, ali i brzog pada koncentracije kod oba inkapsulata (**Slika 4.24 A i B**). Što se tiče M-NA-GA_{sz} inkapsulata, već u OP se primjećuje veća koncentracija otpuštenih UF-a (32,65 mg_{GAE}/g_{IN}) nego što je otpuštena iz preostala dva NA-GA_{sz} inkapsulata, ali i iz M-NA_{sz} i M-NA-ŽEL_{sz} inkapsulata. Tijekom GP su vidljive oscilacije u otpuštanju UF-a, a zatim u IP nema znatnih promjena u kumulativnom otpuštanju u odnosu na GP (**Slika 4.24 C**). Nadalje, iz **Slika 4.25** može se vidjeti da svi NA-GA_{sz} inkapsulati pokazuju sličan trend u udjelu otpuštenih UF-a sa NA_{sz} inkapsulatima (OP > GP > IP) te je u OP otpušteno 67,88 – 71,20 % UF-a, zatim u GP 18,86 – 31,43 % i najmanje u IP u rasponu od 0,70 do 9,95 %.

CS-NA-ŽEL_{sz} inkapsulati pokazuju minimalno otpuštanje tijekom OP, nakon čega slijedi blago povećanje u GP i zatim smanjenje kumulativnog otpuštanja UF-a do kraja GP. Međutim, prelaskom u IP uočeno je značajno povećanje otpuštanja i stabilan trend tijekom ove faze (**Slika 4.24 A**). Sličan trend pratili su i NA-ŽEL_{sz} inkapsulati sa CF i M ekstrakte, uz iznimku da se kod CF-NA-ŽEL_{sz} inkapsulata nakon OP kumulativno otpuštanje UF-a tijekom GP smanjivalo (**Slika 4.24 B i C**). Svi inkapsulati pripremljeni s kombinacijom omotača NA-ŽEL_{sz} pokazali su negativne vrijednosti kumulativnog otpuštanja UF-a u GP od -13,39 do -39,98 %, a zatim odlično otpuštanje u IP (30,51 – 56,46 %) (**Slika 4.25**). Ovo upućuje na prethodno vidljive rezultate iz **Slike 4.24 A – C** gdje se u GP otpuštaju niže koncentracije UF-a nego u IP, a ujedno i na to da kombinacija NA-ŽEL_{sz} omogućava najpoželjniji profil otpuštanja, odnosno najbolju zaštitu tijekom želučane faze te osigurava veće i postepeno otpuštanje UF-a u crijevnoj fazi što bi moglo značiti i potencijalno bolju apsorpciju UF-a u crijevnoj fazi.

Za opisivanje kinetike otpuštanja UF-a ispitani su modeli prvog reda, Higuchi, Korsmeyer-Peppas i Hixson-Crowell model (**Slika P2.1**), a parametri modela i statistički kriteriji korišteni za procjenu uspješnosti aproksimacije eksperimentalnih podataka prikazani su u **Tablici 4.28**.

Model prvog reda, Higuchi i Hixson-Crowell model, pokazali su negativne vrijednosti prilagođenog koeficijenta determinacije (R^2_{adj}) za većinu ispitanih inkapsulata, sugerirajući lošu aproksimaciju eksperimentalnih podataka. Korsmeyer-Peppas model, s druge strane, pokazao je visoke vrijednosti R^2_{adj} za sve NA_{SZ} inkapsulate (0,889 – 0,963) i $NA-GA_{SZ}$ inkapsulate (0,873 – 0,951) što ukazuje da ovaj model dobro aproksimira eksperimentalno dobivene podatke za kinetiku otpuštanja UF-a u ispitivanim uvjetima. Za $NA-ŽEL_{SZ}$ inkapsulate Korsmeyer-Peppas model pokazao je nešto niže R^2_{adj} vrijednosti za CS i CF inkapsulate (0,462 – 0,611), dok je značajno da se kinetika otpuštanja UF-a iz $M-NA-ŽEL_{SZ}$ inkapsulata nije mogla opisati ovim modelom te parametre modela nije bilo moguće odrediti (**Tablica 4.28**).

Tablica 4.28 Procijenjeni **parametri** primijenjenih **matematičkih modela** za opisivanje kinetike **otpuštanja UF-a** (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} – konstante otpuštanja za odgovarajući model; n – eksponent difuzije) iz **CS, CF i M inkapsulata** pripremljenih inkapsulacijom **sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača** (NA_{SZ} , $NA-GA_{SZ}$ i $NA-ŽEL_{SZ}$) te statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela (R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije, AIC – Akaike informacijski kriterij, MSC – kriterij odabira modela)

Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela										
Matematički modeli		CS inkapsulati			CF inkapsulati			M inkapsulati		
		NA_{SZ}	$NA-GA_{SZ}$	$NA-ŽEL_{SZ}$	NA_{SZ}	$NA-GA_{SZ}$	$NA-ŽEL_{SZ}$	NA_{SZ}	$NA-GA_{SZ}$	$NA-ŽEL_{SZ}$
Model prvog reda	R^2_{adj}	-0,464	-0,073	-0,641	-0,558	0,021	-0,178	-0,364	-0,079	-1,479
	AIC	134,382	131,764	138,136	136,299	130,475	133,887	134,748	130,362	147,222
	MSC	-2,332	-1,580	-1,568	-2,248	-1,492	-0,784	-1,684	-1,656	-2,129
	k_1	0,040	0,048	0,031	0,041	0,049	0,013	0,026	0,043	0,024
Higuchi model	R^2_{adj}	-1,004	-0,501	-0,538	-1,118	-0,477	0,121	-0,498	-0,463	-1,226
	AIC	138,896	136,550	137,223	140,826	136,275	129,785	136,079	134,624	145,714
	MSC	-2,655	-1,922	-1,503	-2,571	-1,906	-0,491	-1,779	-1,961	-2,021
	k_H	8,639	8,851	7,996	8,811	8,839	6,725	8,473	8,474	9,054
Hixson-Crowell model	R^2_{adj}	-1,273	-0,790	-0,913	-1,380	-0,826	-0,224	-0,635	-0,800	-1,668
	AIC	140,664	139,010	140,282	142,449	139,223	134,428	137,308	137,528	148,251
	MSC	-2,781	-2,098	-1,722	-2,687	-2,116	-0,823	-1,867	-2,168	-2,202
	k_{HC}	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,003	0,006	0,007	0,006
Korsmeyer-Peppas model	R^2_{adj}	0,963	0,873	0,611	0,910	0,922	0,462	0,889	0,951	-
	AIC	83,525	102,775	118,761	97,381	95,742	123,825	100,523	87,613	-
	MSC	1,300	0,490	-0,195	0,532	0,989	-0,065	0,761	1,397	-
	k_{KP}	73,698	72,207	75,257	77,047	67,023	48,962	61,468	64,742	-
	n	0,056	0,050	0,014	0,049	0,078	0,093	0,084	0,077	-

"-" – parametre modela nije bilo moguće odrediti. Podebljano su označeni statistički kriteriji modela koji najbolje opisuju otpuštanje UFT iz pojedinih inkapsulata.

Vrijednosti parametra n za NA_{SZ} (0,049 – 0,084), $NA-GA_{SZ}$ (0,050 – 0,078) i $NA-ŽEL_{SZ}$ (0,014 – 0,093) inkapsulate (**Tablica 4.28**) koje su manje od 0,45 potvrđuju da je otpuštanje UF-a iz ovih sušenjem zamrzavanjem dobivenih inkapsulata prvenstveno regulirano Fickovim zakonom difuzije. Velika razlika u rasponu parametra n kod $NA-ŽEL_{SZ}$ inkapsulata ukazuje na

još izraženiju difuziju, gdje je kretanje fenolnih spojeva kroz matriks inkapsulata, uvelike ovisan o koncentracijskom gradijentu (Boostani i Jafari, 2021). Prisutnost želatine, poznate po svojim svojstvima stvaranja gela, mogla je utjecati na to da mreža inkapsulata bude ujednačenija ili gušća, time utječući na difuziju fenolnih spojeva (Luchese i sur., 2018; Luo, 2022).

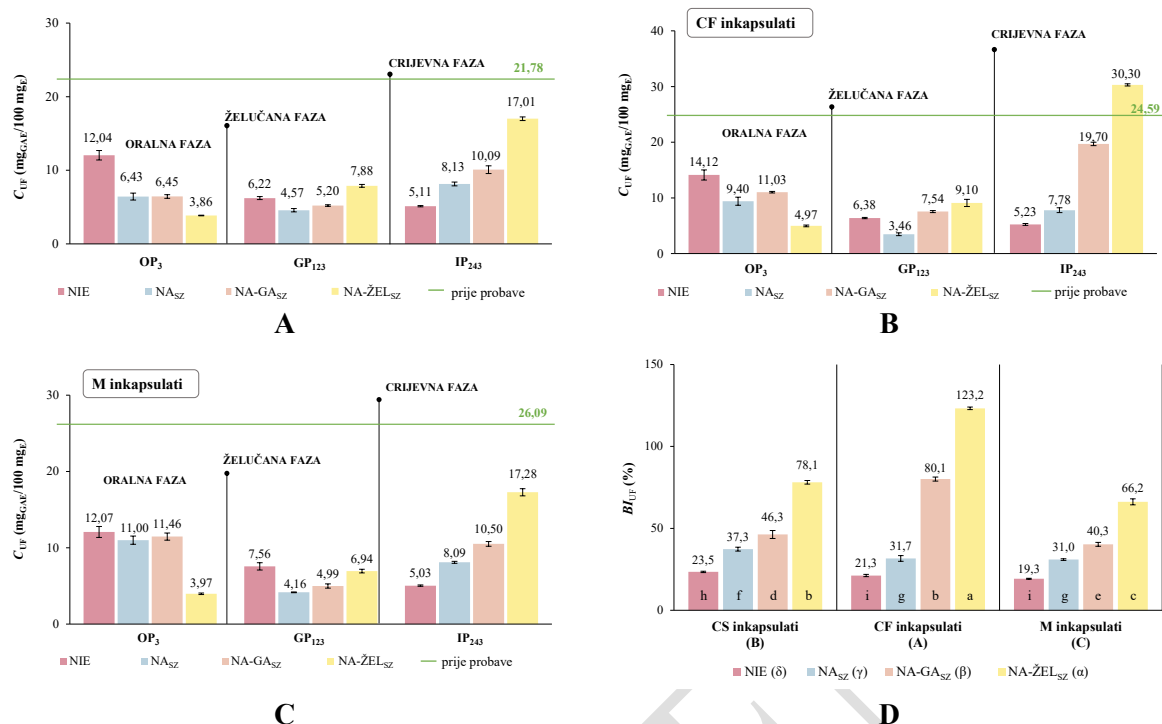
Vrijednosti parametra k_{KP} za sve NA_{SZ} inkapsulate iznosile su 61,468 – 77,047; za $NA-GA_{SZ}$ inkapsulate 64,742 – 72,207 te za $NA-ŽEL_{SZ}$ inkapsulate 48,962 – 75,257 (**Tablica 4.28**). Ove vrijednosti ukazuju da dodatak GA ili ŽEL alginatu utječe na svojstva inkapsulata, modulirajući tako brzinu otpuštanja fenolnih spojeva. Inkapsulati koji sadrže ŽEL pokazuju najširi raspon k_{KP} vrijednosti, što ukazuje na potencijalno značajniji utjecaj želatine na modificiranje brzine otpuštanja, vjerojatno zbog njezine interakcije s fenolnim spojevima ili njezinog utjecaja na strukturu matriksa inkapsulata (Luchese i sur., 2018; Shahidi i Dissanayaka, 2023).

4.5.5. Biodostupnost fenolnih spojeva iz različitih ekstrakata i njihovih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem - utjecaj omotača i ekstrakta

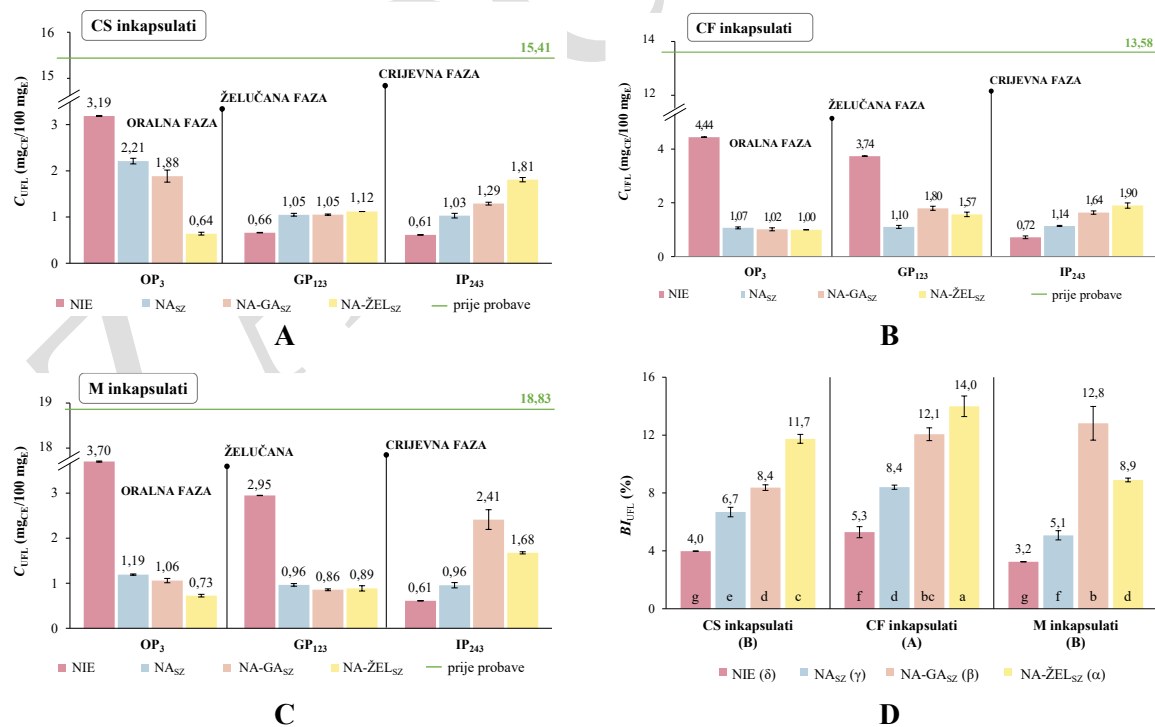
Neinkapsulirani CS, CF i M ekstrakti te njihovi inkapsulati dobiveni pomoću različitih omotača (NA_{SZ} , $NA-GA_{SZ}$, $NA-ŽEL_{SZ}$) podvrgnuti su *in vitro* simuliranoj probavi slijedeći INFOGEST protokol (Brodkorb i sur., 2019) uz prisustvo enzima. Simulirana probava provedena je kroz OP, GP i IP faze tijekom kojih su prikupljeni uzorci na kraju svake faze te su u njima analizirane koncentracije otpuštenih UF, UFL i UPA i pojedinačnih fenolnih spojeva kako bi se ispitao utjecaja različitih omotača i ekstrakta na profil otpuštanja analiziranih spojeva te na njihovu biodostupnost (BI) izračunatu prema **izrazu (3.31)**. Udio fenolnih spojeva u NIE uzorcima prikazan je na **Slici 4.2** i u **Tablici 4.3** prije probave.

4.5.5.1. Biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

Maseni udio kumulativno otpuštenih fenolnih spojeva (mg fenolnog spoja na 100 mg ekstrakta) iz NIE i inkapsuliranih CS, CF i M ekstrakata tropa grožđa u probavne tekućine na kraju OP, GP i IP te BI za navedene uzorke nakon simulirane probave prikazani su na **Slikama 4.26 – 4.28 A – D**.

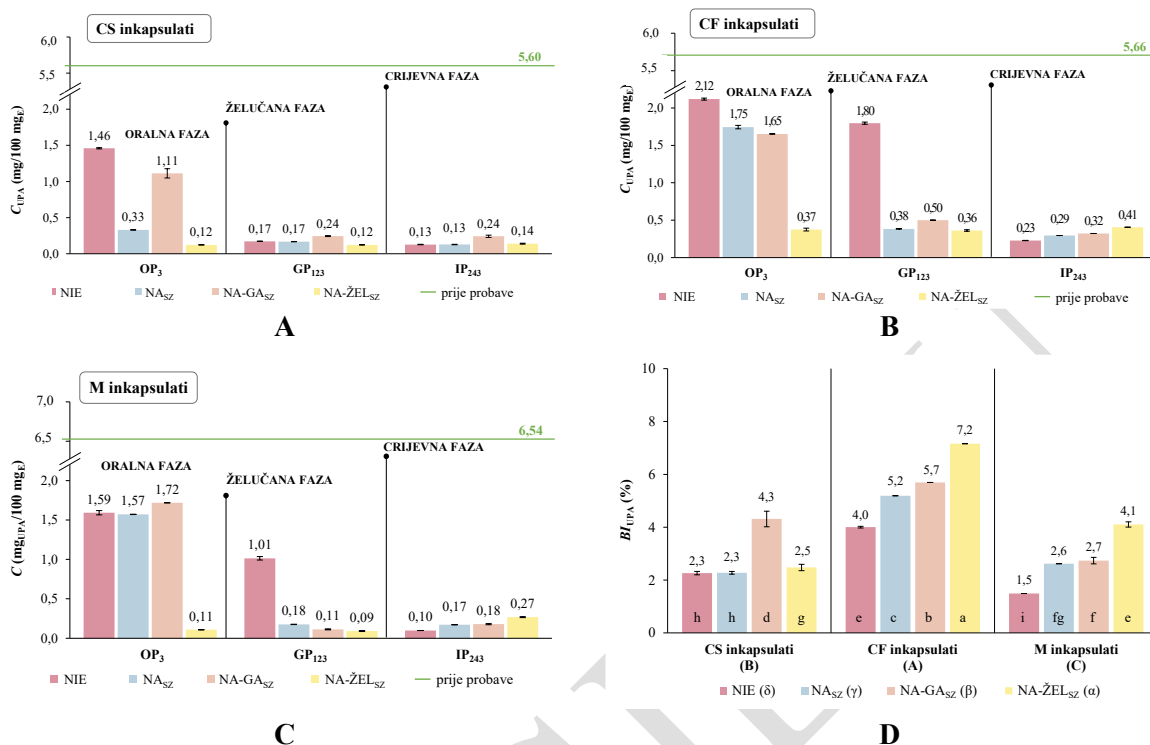


Slika 4.26 Maseni udio UF-a (C_{UF} , mg_{GAE}/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UF-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ZEL_{SZ}) te indeks biodostupnosti (BI_{UF}) UF-a ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$.



Slika 4.27 Maseni udio UFL-a (C_{UFL} , mg_{CE}/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UFL-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ZEL_{SZ}) te

indeks biodostupnosti (*BI*) UFL-a ispitivanih uzoraka (**D**). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$.



Slika 4.28 Maseni udio UPA (C_{UPA} , mg/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UPA na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (**A**), CF (**B**) i M (**C**) inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ZEL_{SZ}) te indeks biodostupnosti (*BI*) UPA ispitivanih uzoraka (**D**). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$.

Za sve NIE, kumulativno otpuštanje UF-a, UFL-a i UPA bilo je najveće je tijekom OP faze te se udio fenolnih spojeva smanjivao u GP fazi i dalje prema IP fazi (Slike 4.28 – 4.30 (A, B, C)) kao što je ranije raspravljeno kod rezultata ionskog geliranja (poglavlje 4.4.4.1) s obzirom na to da se radi o istim NIE uzorcima koji su podvrgnuti probavi. Takav trend otpuštanja je i očekivan zbog početne izloženosti probavnom procesu i ubrzane difuzije koja se odvija na početku procesa probave. Ovaj trend sugerira da se fenolni spojevi ekstrakata razgrađuju prije nego što dosegnu intestinalnu fazu što nije poželjno jer je cilj imati veće otpuštanje u IP gdje se odvija njihova potencijalna apsorpcija (Grgić i sur., 2020).

Kod inkapsuliranih uzoraka nije uočen dosljedan trend otpuštanja za sve inkapsulate u pogledu udjela otpuštenih UF-a, UFL-a i UPA. Svi inkapsulati pripremljeni s omotačima NA_{SZ} i NA-GA_{SZ} pokazuju sličan trend otpuštanja UF-a pri čemu nakon OP faze dolazi do smanjenja udjela otpuštenih UF-a u GP te potom do porasta udjela otpuštenih UF-a u IP fazi probave gdje

je taj udio bio veći za 1,8 – 2,6 puta u odnosu na GP fazu. Ovaj trend otpuštanja ukazuje na to da ovi omotači imaju određeni zaštitni učinak za zadržavanje UF-a tijekom početnih faza probave te omogućuju oslobađanje UF-a u crijevnoj fazi **Slika 4.26 A – C**.

Trend otpuštanja UFL-a iz CS-NA_{SZ} i M-NA_{SZ} bio sličan onom za NIE međutim pad kumulativnog otpuštanja tijekom simulirane probave je manje izražen u odnosu na NIE, što ukazuje na određeni zaštitni učinak ovog omotača u pogledu UFL-a (**Slika 4.27 A i C**), dok je kod CF-NA_{SZ} inkapsulata vidljivo neznatno povećanje otpuštanja UFL-a u GP i IP (**Slika 4.27 B**). U slučaju CS-NA-GA_{SZ} i M-NA-GA_{SZ} inkapsulata vidljiv pad udjela UFL-a od OP do GP, a zatim porast u IP i to za 1,2 – 2,8 puta u odnosu na GP (**Slika 4.27 A i C**). Suprotno tome, kod CF-NA-GA_{SZ} inkapsulata vidljiv porast UFL-a u GP u odnosu na OP i zatim pad udjela UFL-a u IP (**Slika 4.27 B**).

Kod UPA, za NA_{SZ} inkapsulate udio kumulativno otpuštenih UPA smanjivao se od OP prema IP fazi. Za sve NA-GA_{SZ} inkapsulate također postoji smanjenje otpuštanja u GP u odnosu na OP fazu no međutim nije uočen dosljednost u pogledu trenda otpuštanja UPA u IP kod analiziranih inkapsulata (**Slika 4.28 A – C**). Ovo ukazuje na određenu razinu zaštitnog učinka kombinacije NA-GA_{SZ} na UPA.

Sveukupno, otpuštanje UF-a, UFL-a i UPA bilo je najbolje u IP fazi kod svih NA-ŽEL_{SZ} inkapsulata gdje je udio ispitivanih fenolnih spojeva bio veći za 1,1 – 3,3 puta u odnosu na GP (**Slike 4.26 – 4.28 (A, B, C)**) što ukazuje da ovaj omotač ima zaštitni učinak od otpuštanja fenolnih spojeva u ranijim fazama probave.

Sukladno prethodno navedenim rezultatima, najmanje vrijednosti *BI* za sve skupine ukupnih fenola utvrđene su kod NIE uzoraka (19,3 – 23,5 % za UF; 3,2 – 5,3 %, za UFL i 1,5 – 4,0 % za UPA) dok je inkapsulacija uz primjenu svih omotača dovela do povećana biodostupnosti fenolnih spojeva. Najveći učinak na povećanje biodostupnosti za sve fenolne spojeve u odnosu na NIE imala je inkapsulacija uz primjenu NA-ŽEL_{SZ} omotača i to sa *BI* vrijednostima 66,2 – 123,2 % za UF, te za UFL 8,9 – 14,0 % i za UPA 2,5 – 7,2 %, a potom inkapsulacija s NA-GA_{SZ} te su najmanje *BI* vrijednosti za inkapsulirane uzorke utvrđene kod NA_{SZ} inkapsulata (31,0 – 37,3 % za UF, te za UFL 5,1 – 8,4 % i za UPA 2,3 – 5,2 %. (**Slike 4.26 - 4.28(D)**)).

Statistička analiza utjecaja omotača i ekstrakta prema faktorskom ANOVA testu na *BI* vrijednosti prikazana je **Tablicama 4.29 – 4.31**.

Tablica 4.29 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UF-a - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{sz}, NA-GA_{sz}, NA-ŽEL_{sz}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	23991,33	3	7997,11	4915,12	0,0000 *	74,2 %
Ekstrakt	3939,89	2	1969,95	1210,75	0,0000 *	12,2%
Omotač × ekstrakt	4356,58	6	726,10	446,27	0,0000 *	13,5 %
Pogreška	39,05	24	1,63			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Tablica 4.30 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UFL-a - značajnost utjecaja (ne)omotača (NA_{sz}, NA-GA_{sz}, NA-ŽEL_{sz}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	339,865	3	113,288	526,61	0,0000 *	77,1 %
Ekstrakt	43,763	2	21,882	101,72	0,0000 *	9,9 %
Omotač × ekstrakt	52,257	6	8,710	40,49	0,0000 *	11,8 %
Pogreška	5,163	24	0,215			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Tablica 4.31 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UPA - značajnost utjecaja (ne)omotača (NA_{sz}, NA-GA_{sz}, NA-ŽEL_{sz}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem u odnosu na *BI* te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	21,8460	3	7,2820	644,39	0,0000 *	23,2%
Ekstrakt	59,5854	2	29,7927	2636,38	0,0000 *	63,1 %
Omotač × ekstrakt	12,6626	6	2,1104	186,75	0,0000 *	13,4 %
Pogreška	0,2712	24	0,0113			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Rezultati pokazuju da su oba faktora (omotač i ekstrakt) imali statistički značajan utjecaj na *BI* vrijednosti UF-a, UFL-a i UPA kod inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem te postoji statistički značajna interakcija između faktora.

Kod UF-a, utjecaj faktora „omotač“ imao najveći utjecaj na varijabilnost svih podataka (74,2 % varijance) uz najveće vrijednost *BI* za UF kod inkapsulata kod kojih je kao omotač korištena kombinacija NA-ŽEL_{sz}. Varijabilnost *BI* vrijednosti UF-a s obzirom na korišteni ekstrakt te interakciju između omotača i ekstrakta podjednako su doprinosile varijanci s 12,2 %, odnosno 13,5 %. Općenito, inkapsulati CF ekstrakta imali su najveće, M inkapsulati najmanje *BI* vrijednosti za UF (Tablica 4.29).

Utjecaj „omotača“ na *BI* vrijednosti UFL-a bio je najizraženiji te je varijabilnost podataka s obzirom na ovaj faktor s 77,1 % utjecala na varijancu. Kao i u slučaju *BI* za UF, i ovdje je najveća biodostupnost zabilježena u slučaju inkapsulacije uz korištenje omotača NA-ŽEL. Ekstrakt je utjecao na varijabilnost vrijednosti *BI* za UFL s 9,9 % varijance, a također su inkapsulirani CF ekstrakti imali su najveću biodostupnost UFL-a, dok nije postojala statistički značajna razlika u biodostupnosti UFL-a između CS i M inkapsulata (**Tablica 4.30**).

U slučaju UPA za razliku od UF i UFL-a utjecaj faktora „ekstrakt“ imao najveći utjecaj na varijabilnost svih podataka (63,1 % varijance), potom faktor „omotač“ (23,2 % varijance) te interakcija ova dva faktora (13,4 % varijance). Ponovo je najveća biodostupnost zabilježena u slučaju inkapsulacije CF ekstrakta, dok su najniže *BI* vrijednosti za UPA zabilježene kod inkapsulata koji su sadržavali M ekstrakte. S obzirom na utjecaj omotača, i u ovom slučaju, najveće vrijednosti *BI* zabilježene su kod NA-ŽEL_{SZ} inkapsulata (**Tablica 4.31**).

Zaključno, najniže *BI* vrijednosti zabilježene su kod neinkapsuliranih uzoraka, što potvrđuje nužnost primjene inkapsulacije u svrhu zaštite i poboljšanja biodostupnosti i potencijalne apsorpcije bioaktivnih spojeva. Statistička analiza pokazuje da biodostupnost svih analiziranih ukupnih fenolnih spojeva ovisi o omotaču, ekstraktu i njihovoj interakciji gdje je utjecaj omotača bio dominantan. Kombinacija omotača NA-ŽEL_{SZ} pokazala se najučinkovitijom u pogledu profila otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem tijekom simulirane probe *in vitro* te rezultirala je najvećim vrijednostima *BI* fenolnih spojeva s izuzetkom za UPA kod CS inkapsulata (**Slikama 4.26 – 4.28 D**).

4.5.5.2. Biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva

Profil otpuštanja fenolnih spojeva iz CS-NIE, CF-NIE i M-NIE te CS, CF i M inkapsulata tijekom tri faze simulirane probave prikazani su u **Tablicama P2.1 – 2.3**. U **Tablici 4.32** prikazane su *BI* vrijednosti samo za one ekstrakte i inkapsulate za koje je bilo moguće izračunati *BI* odnosno koji su detektirani nakon kompletne probave odnosno nakon IP faze probave (ukupno 15 spojeva: galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, epikatehin, katehin, epikatehin galat, galokatehin galat, procijanidin B2, rutin, oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid). Statistička analiza značajnosti utjecaja omotača i ekstrakta na biodostupnost pojedinačnih fenola prikazana u **Tablicama 4.32 i 4.33**.

Tablica 4.32 Biodostupnost (*BI*, %) pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranih ekstrakata (NIE) i iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem s obzirom na korišteni omotač (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) i ekstrakt tropa grožđa (CS, CF, M), te statistička značajnost utjecaja omotača i ekstrakta na *BI* fenolnih spojeva prema faktorskom ANOVA testu (Duncanov *post-hoc* test, $p < 0,05$)

Fenolni spoj	Uzorak		BI (%) [*]					
Fenolne kiseline								
Galna kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^A	
	NIE	α	22,4 ± 0,8	f	108,8 ± 4,9	a	47,4 ± 0,3	d
	NA _{SZ}	δ	4,8 ± 0,6	h	12,3 ± 0,6	g	14,5 ± 0,1	g
	NA-GA _{SZ}	β	32,6 ± 0,5	e	69,8 ± 0,9	c	46,2 ± 0,0	d
	NA-ŽEL _{SZ}	γ	26,2 ± 4,4	f	7,3 ± 0,0	h	88,5 ± 0,3	b
3,4-Dihidroksi-benzojeva kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^C		CF ^A		M ^B	
	NIE	γ	18,3 ± 0,6	h	70,6 ± 0,4	b	12,3 ± 0,2	i
	NA _{SZ}	δ	10,3 ± 0,3	j	35,7 ± 0,2	e	11,4 ± 0,1	ij
	NA-GA _{SZ}	α	28,8 ± 0,7	g	124,5 ± 2,1	a	31,1 ± 0,0	f
	NA-ŽEL _{SZ}	β	31,5 ± 0,2	f	66,0 ± 0,0	c	47,5 ± 0,7	d
Vanilinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
	NIE	δ	22,9 ± 1,1	f	29,6 ± 0,0	de	22,1 ± 0,7	f
	NA _{SZ}	γ	42,3 ± 5,9	c	26,2 ± 0,9	ef	32,7 ± 2,4	d
	NA-GA _{SZ}	β	57,4 ± 1,9	b	35,2 ± 0,4	d	52,9 ± 0,0	b
	NA-ŽEL _{SZ}	α	70,9 ± 5,9	a	47,1 ± 0,0	c	53,1 ± 0,8	b
Siringinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
	NIE	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{SZ}	α	0,0	b	78,3 ± 8,5	a	0,0	b
	NA-ŽEL _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
Elaginska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^C		CF ^B		M ^A	
	NIE	δ	1,7 ± 0,1	j	1,6 ± 0,0	j	15,5 ± 0,5	fg
	NA _{SZ}	γ	13,4 ± 0,4	gh	16,5 ± 0,2	f	19,2 ± 0,3	e
	NA-GA _{SZ}	β	6,5 ± 0,1	i	11,9 ± 0,6	h	37,5 ± 1,2	b
	NA-ŽEL _{SZ}	α	27,3 ± 0,7	c	23,6 ± 0,0	d	80,7 ± 3,1	a
o-Kumarinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^B		M ^B	
	NIE	δ	78,7 ± 12,4	gh	48,1 ± 0,3	i	61,7 ± 0,6	hi
	NA _{SZ}	γ	209,8 ± 4,1	d	110,6 ± 3,4	f	161,4 ± 0,9	e
	NA-GA _{SZ}	α	353,2 ± 5,2	b	424,2 ± 13,2	a	242,2 ± 0,0	c
	NA-ŽEL _{SZ}	β	207,2 ± 23,4	d	101,4 ± 0,0	fg	247,4 ± 25,4	c
p-Kumarinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
	NIE	α	87,0 ± 3,3	b	272,8 ± 49,0	a	65,4 ± 2,5	b
	NA _{SZ}	β	20,0 ± 0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-GA _{SZ}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-ŽEL _{SZ}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
Flavanoli								
Epikatehin	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
	NIE	δ	49,8 ± 1,1	d	0,0	g	15,6 ± 0,2	f
	NA _{SZ}	α	259,4 ± 6,4	a	30,6 ± 0,2	e	89,0 ± 1,6	c
	NA-GA _{SZ}	β	245,6 ± 8,7	b	14,8 ± 0,4	f	91,7 ± 0,0	c
	NA-ŽEL _{SZ}	γ	222,6 ± 0,1	e	30,1 ± 0,3	e	90,1 ± 6,5	c
Katehin	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-ŽEL _{SZ}	α	0,0	b	0,0	b	20,9 ± 0,4	a
Epikatehin galat	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
	NIE	δ	116,8 ± 13,2	h	98,8 ± 0,2	h	88,7 ± 8,8	h
	NA _{SZ}	γ	582,6 ± 49,5	d	79,1 ± 3,3	h	332,4 ± 13,0	f
	NA-GA _{SZ}	β	659,9 ± 3,4	c	159,7 ± 8,7	g	474,6 ± 0,0	e
	NA-ŽEL _{SZ}	α	958,9 ± 12,4	a	168,9 ± 0,0	g	713,7 ± 29,5	b

Fenolni spoj	Uzorak	BI (%) [*]						
		omotač / ekstrakt	CS ^A		CF ^C		M ^B	
Galokatehin galat	NIE	δ	251,4 ± 10,4	h	150,0 ± 4,7	i	234,0 ± 0,2	h
	NA _{SZ}	γ	456,2 ± 11,8	e	294,6 ± 4,6	g	365,2 ± 3,4	f
	NA-GA _{SZ}	β	660,3 ± 17,6	c	353,8 ± 1,1	f	581,2 ± 0,0	d
	NA-ŽEL _{SZ}	α	987,3 ± 7,9	b	473,0 ± 0,0	e	1028,4 ± 10,0	a
Procijanidin B2	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
	NIE	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{SZ}	α	0,0	b	27,6 ± 5,0	a	0,0	b
	NA-ŽEL _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
Flavonoli								
Rutin	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
	NIE	α	0,0	b	29,0 ± 2,8	a	0,0	b
	NA _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-ŽEL _{SZ}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
Antocijani								
Oenin klorid	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	α	34,4 ± 2,8	b	32,7 ± 2,9	b	62,6 ± 4,5	a
	NA _{SZ}	β	8,7 ± 0,2	ef	12,2 ± 1,4	de	27,4 ± 0,3	c
	NA-GA _{SZ}	γ	0,0	g	8,2 ± 0,6	ef	8,7 ± 0,4	ef
	NA-ŽEL _{SZ}	β	14,2 ± 0,2	d	6,2 ± 0,5	f	24,5 ± 0,6	c
Peonidin-3-O-glukozid klorid	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	α	24,7 ± 4,3	b	24,0 ± 2,9	b	42,4 ± 5,9	a
	NA _{SZ}	β	0,0	d	9,3 ± 0,4	c	22,5 ± 0,6	b
	NA-GA _{SZ}	γ	0,0	d	0,0	d	0,0	d
	NA-ŽEL _{SZ}	γ	0,0	d	0,0	d	0,0	d

* srednje vrijednosti ± SD pojedinih grupa podataka; različita slova (velika, mala te mala slova grčke abecede) označavaju statistički značajno različite skupove podataka za svaki faktor

Tablica 4.33 Statistička značajnost utjecaja omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) na BI pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranih ekstrakata i njihovih inkapsulata dobivenih suženjem zamrzavanjem prema faktorskom ANOVA testu te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Fenolni spoj		Faktor	p	Veličina efekta
Fenolne kiseline	Galna kiselina	omotač	0,0000 *	32,5 %
		ekstrakt	0,0000 *	16,7 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	50,6 %
	3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	omotač	0,0000 *	25,0 %
		ekstrakt	0,0000 *	56,2 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	18,7 %
	Vanilinska kiselina	omotač	0,0000 *	70,5 %
		ekstrakt	0,0000 *	14,5 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	13,5 %
	Siringinska kiselina	omotač	0,0000 *	27,1 %
		ekstrakt	0,0000 *	18,1 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	54,2 %
	Elaginska kiselina	omotač	0,0000 *	45,6 %
		ekstrakt	0,0000 *	34,2 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	20,1 %
	o-Kumarinska kiselina	omotač	0,0000 *	77,5 %

Flavanoli	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	ekstrakt	0,0000 *	2,5 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	19,4 %
		omotač	0,0000 *	61,5 %
		ekstrakt	0,0000 *	8,4 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	28,4 %
	Epikatehin	omotač	0,0000 *	28,4 %
		ekstrakt	0,0000 *	38,6 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	32,9 %
	Katehin	omotač	0,0000 *	27,3 %
		ekstrakt	0,0000 *	18,2 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	54,5 %
	Epikatehin galat	omotač	0,0000 *	41,3 %
		ekstrakt	0,0000 *	41,9 %
omotač × ekstrakt		0,0000 *	16,6 %	
Galokatehin galat	omotač	0,0000 *	70,5 %	
	ekstrakt	0,0000 *	19,5 %	
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	10,0 %	
Procijanidin B2	omotač	0,0000 *	26,8 %	
	ekstrakt	0,0000 *	17,9 %	
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	53,6 %	
Flavonoli	Rutin	omotač	0,0000 *	27,1 %
		ekstrakt	0,0000 *	18,1 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	54,3 %
Antocijani	Oenin klorid	omotač	0,0000 *	70,3 %
		ekstrakt	0,0000 *	21,0 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	8,2 %
	Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	omotač	0,0000 *	78,5 %
		ekstrakt	0,0000 *	9,5 %
omotač × ekstrakt		0,0000 *	10,6 %	

* statistički značajan utjecaj uz $p < 0,05$

Faktorijalni ANOVA test pokazuje da su oba faktora (omotač i ekstrakt) imali statistički značajan utjecaj na *BI* vrijednosti fenolnih kiselina, flavanola, flavonola i antocijana kod inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem te da postoji statistički značajna interakcija između faktora (**Tablica 4.33**). Utjecaj faktora „omotač“ bio je dominantan na varijabilnost *BI* kod 12 pojedinačnih fenolnih (25,0 % – 77,5 % varijance), dok je utjecaj faktora ekstrakt“ imao najveći utjecaj na varijabilnost *BI* 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline, epikatehina i epikatehin galata s 38,6 – 56,2 % varijance. Iako je iz podataka navedenih u **Tablici 4.32** vidljivo da je inkapsulacija sušenjem zamrzavanjem općenito doprinijela povećanju vrijednosti *BI* određenih pojedinačnih spojeva (osim galne kiseline, *p*-kumarinske kiseline, rutina, oenin klorida i peonidin-3-*O*-glukozid klorid) daljinom statističkom analizom (Duncanov test, $p < 0,05$) nije utvrđen dominantan omotač niti ekstrakt koji je najviše/najmanje doprinio povećanju biodostupnosti svih pojedinačnih spojeva u odnosu na NIE. Tome u prilog ide i visok doprinos utjecaja interakcije omotača i ekstrakta na varijabilnosti *BI* vrijednosti svih pojedinačnih

spojeva koji je sezao i do 54,5% varijance (Tablice 4.32 i 4.33). Osim toga, *BI* je bio veći u većini slučajeva kada je uz NA_{SZ} korišten i drugi omotač. Kod 5 fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, elaginska kiselina, katehin, epikatehin galat i galokatehin galat) najveći *BI* je postignut korištenjem $NA-\check{Z}EL_{SZ}$, kod 4 fenolna spoja (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, siringinska kiselina i *o*-kumarinska kiselina, procijanidin B2) najveći *BI* postignut korištenjem $NA-GA_{SZ}$ omotača te kod epikatehina najveći *BI* ostvaren je kada je korišten NA_{SZ} kao omotač.

Fenolne kiseline su tijekom simulirane *in vitro* probave NIE i inkapsulata pokazale različitu stabilnost i profil otpuštanja u ovisnosti o ekstraktu i omotaču. Nakon kompletne probave uzoraka detektirane su galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina dok su *p*-hidroksibenzojeva kiselina, ferulinska i kafeinska kiselina detektirane samo u uzorcima prije probave (Tablice 4.3 i 4.32, Tablice P2.1 – P2.3). Kod galne kiseline inkapsulati pripremljeni s različitim omotačima nisu utjecali na povećanje *BI* ove kiseline u odnosu na NIE, a najveći *BI* galne kiseline je zabilježen kod CF-NIE uzorka (108,8 %). 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina i vanilinska kiselina pokazale su sličan trend otpuštanja iz svih ekstrakata i inkapsulata odnosno nisu detektirane u OP i GP fazama probave što ukazuje na njihovu nisku stabilnost ili nisku početnu koncentraciju. Međutim, nakon kompletne probave odnosno u IP fazi ove kiseline su detektirane u NIE i inkapsulatima s tim da su njihove koncentracije bile u većini slučajeva više u inkapsulatima u odnosu na NIE što sugerira da se njihova biodostupnost povećavala inkapsulacijom. Kod 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline $NA-GA_{SZ}$ inkapsulati su imali 1,6 – 2,5 puta veće *BI* vrijednosti ove kiseline, a većina $NA-\check{Z}EL_{SZ}$ (izuzev CF- $NA-\check{Z}EL_{SZ}$) inkapsulata 1,7 – 3,9 puta veće vrijednosti *BI* u odnosu na NIE, dok NA_{SZ} omotači nisu utjecali na povećanje *BI* u odnosu na NIE. Najveći *BI* (124,5 %) ove kiseline postignut je kod CF- $NA-GA_{SZ}$ inkapsulata. Kod vanilinske kiseline najveći *BI* (70,9 %) ostvaren je kod CS- $NA-\check{Z}EL_{SZ}$ inkapsulata, a općenito većina inkapsulata (izuzev CF- NA_{SZ}) su imali veći *BI* u odnosu na NIE ($NA-\check{Z}EL_{SZ}$ 1,6 – 3,1 puta, $NA-GA_{SZ}$ 1,2 – 2,4 puta i NA_{SZ} 1,5 – 1,8 puta). Siringinska kiselina otpuštala se iz NIE i inkapsulata uglavnom u OP i GP fazi s izuzetkom kod CF- $NA-GA_{SZ}$ inkapsulata kada je detektirana u IP fazi što je rezultiralo sa *BI* od 78,3 %, što sugerira da je ova kiselina podložna degradaciji ili manje učinkovito zaštićena liofilizacijom. Profil otpuštanja elaginske kiseline po probavnim fazama razlikovao se ovisno o ekstraktu i primijenjenom omotaču, ali u svim slučajevima je ova kiselina kvantificirana u IP fazi. Svi inkapsulati imali su veći *BI* u odnosu na NIE i to $NA-\check{Z}EL_{SZ}$ inkapsulati 5,2 – 16,1 puta; $NA-GA_{SZ}$ 2,4 – 7,4 puta i NA_{SZ} 1,2 – 10,3 puta. Najmanje *BI* vrijednosti ove kiseline zabilježene su kod CS inkapsulata,

a najveće kod M-NA-ŽEL_{sz} inkapsulata (80,7 %). Kod *o*-kumarinske kiseline uočen je veći *BI* kod svih inkapsulata (NA-GA_{sz} za 3,9 – 8,8 puta, NA-ŽEL_{sz} za 2,1 – 4,0 puta, te NA_{sz} inkapsulati za 2,3 – 2,7 puta) u odnosu na NIE. Nije postojala statistički značajna razlika između *BI* vrijednosti za *o*-kumarinsku kiselinu s obzirom na ekstrakt dok je omotač NA-GA_{sz} imao najveći utjecaj na *BI* ove kiseline s najvećom vrijednošću *BI* (424,2 %) kod CF-NA-GA_{sz} inkapsulata. Za *p*-kumarinsku kiselinu bilo je moguće odrediti *BI* samo za NIE koji se kretao u rasponu ovisno o ekstraktu 65,4 % do 272,8 %. Pozitivan učinak inkapsulacije na *BI* ove kiseline nije dokazan (**Tablice 4.3 i 4.32, Tablice P2.1 – P2.3**).

Flavanoli igraju ključnu ulogu zbog svojih svojstava koja imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, uključujući dobrobiti za kardiovaskularni sustav i antioksidativno djelovanje (González-Manzano i sur., 2004). Kod većine kvantificiranih flavanola prikazanih u **Tablici 4.32** vidljivo je da je da je inkapsulacija u određenoj mjeri utjecala na veću biodostupnosti ovih spojeva u odnosu na NIE primjenom jednog ili više omotača. Kod epikatehina, *BI* vrijednost je bila veća kod inkapsulata za 4,5 – 5,8 puta u odnosu na NIE, a najveći *BI* (259,4 %) imali su CS-NA_{sz} inkapsulati. Katehin je pokazao manju stabilnost i otpuštanje tijekom probave u odnosu na epikatehin. Sličan trend otpuštanja katehina uočen je u gotovo svim uzorcima, s manjim otpuštanjem samo u OP i GP dok u IP fazi nije detektiran. Ovo zapažanje moglo bi značiti da je katehin ili više osjetljiv na razgradnju tijekom probave ili da su sušenje zamrzavanjem i korišteni omotači manje učinkoviti za očuvanje katehina u usporedbi s epikatehinom. Izuzetak je bio M-NA-ŽEL_{sz} inkapsulat gdje je u svim fazama probave detektiran katehin i utvrđen je *BI* od 20,9 %. Kod epikatehin galata i galokatehin galata najveće vrijednost *BI* imali su NA-ŽEL_{sz} inkapsulati (za 1,6 – 8,2 puta veći *BI* u odnosu na NIE). Pri tome je najveći *BI* epikatehin galata određen kod CS-NA-ŽEL_{sz} inkapsulata (958,9 %) te *BI* galokatehin galata kod M-NA-ŽEL_{sz} inkapsulata (1028,4 %). Procijanidin B1 i procijanidin B2 detektirani su nižim koncentracijama uglavnom u ranijim fazama probave dok je u IP fazi nakon kompletne faze probave detektiran samo procijanidin B2 u slučaju inkapsulata CF-NA-GA_{sz} te je *BI* iznosio 27,6 %. Navedeno opažanje sugerira da su procijanidin B1 i B2 osjetljivi na uvjete probave pa se brzo razgrađuju ili stvaraju komplekse s drugim spojevima (**Tablice 4.3. i 4.32, Tablice P2.1 – P2.3**).

Flavonol kvercetin je detektiran u vrlo niskim koncentracijama u OP i GP ili uopće nije detektiran, bez obzira je li bio inkapsuliran ili ne, i nije detektiran u IP. Slično, rutin i kempferol nisu detektirani ili su pokazali minimalno otpuštanje tijekom ranijih faza probave, što ukazuje na moguću degradaciju u ranim fazama probave ili neučinkovitu inkapsulaciju. Rutin je

detektiran samo tijekom probave CF-NIE te mu je *BI* iznosio 29,0 % (Tablice 4.3. i 4.32, Tablice P2.1 – P2.3).

Stilbeni resveratrol i ϵ -viniferin nisu bili detektirani tijekom simulirane *in vitro* probave nego samo prije probave u NIE (Tablica 4.3, Tablice P2.1 – P2.3). Ovo ukazuje na to da se ti spojevi razgrađuju tijekom procesa liofilizacije i pod uvjetima probave, što je u skladu s literaturnim navodima da su ovi spojevi osjetljivi na uvjete poput promjene pH vrijednosti, temperature i enzimске aktivnosti koje prevladavaju tijekom probave (Fuloria i sur., 2022).

Antocijani, pigmenti topivi u vodi odgovorni za crvenu, ljubičastu i plavu boju mnogih voća i povrća, imaju svojstva koja utječu na zdravlje i povezana su s antioksidativnim i protuupalnim učincima (Sirohi i sur., 2020). Međutim, njihova stabilnost i otpuštanje tijekom probave mogu biti izazovni zbog njihove osjetljivosti na promjene pH vrijednosti i probavne enzime (He i Giusti, 2010; Kamonpatana i sur., 2012). Za većinu kvantificiranih antocijana (mirtilin klorid, petunidin klorid, kuromanin klorid, kalistefin klorid) nije bilo moguće odrediti *BI* budući da su dokazani samo u početnim ekstraktima prije probave ili su dokazani u niskim koncentracijama u početnim fazama probave (OP i GP). To ukazuje da su ovi antocijani vrlo osjetljivi na razgradnju ili da nisu dobro inkapsulirani, naglašavajući potrebu za učinkovitijim strategijama inkapsulacije koje mogu zaštititi antocijane tijekom uvjeta probave. Za oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid najveće vrijednosti *BI* određene su u M-NIE uzorku i to 62,6 %, odnosno 42,4 % što znači da inkapsulacija nije doprinijela povećanju biodostupnosti ovih antocijana (Tablice 4.3. i 4.32, Tablice P2.1 – P2.3).

Prema rezultatima dobivenim u poglavlju 4.5 može se zaključiti da su omotač i ekstrakt kao i njihova interakcija značajno utjecali na EE_{SZ} te da je omotač imao ključnu ulogu u očuvanju fenolnih spojeva tijekom inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem, pri čemu je primjena kombinacije polimera, posebno želatine uz natrijev alginat (NA-ŽEL_{SZ}), povećala EE_{SZ} 1,2 puta u odnosu na sam alginat. U pogledu ekstrakta ostvarena je veća EE_{SZ} kod uzorka CS i M u odnosu na CF inkapsulate.

Profil kumulativnog otpuštanja UF-a pokazao je da različiti omotači moduliraju dinamiku otpuštanja. Termofizikalna i strukturna analiza pokazala je da su svi inkapsulati imali amorfni oblik, što je pozitivno utjecalo na otpuštanje i *BI* fenolnih spojeva u crijevnoj fazi. Kinetika otpuštanja većine uzoraka dobro se opisala Korsmeyer–Peppas modelom, osim M-NA-ŽEL_{SZ} inkapsulata, što naglašava potencijalnu ulogu omotača u moduliranju otpuštanja i očuvanju funkcionalnih svojstava spojeva tijekom probave.

Omotač i ekstrakt značajno su utjecali na biodostupnost UF-a, UFL-a i UPA, uz značajnu interakciju između faktora. Dominantan utjecaj omotača zabilježen je za *BI* kod UF-a i UFL-a dok je na za *BI* UPA najveći utjecaj imao ekstrakt. Najveće *BI* vrijednosti postignute su kombinacijom NA-ŽEL_{sz}, dok su neinkapsulirani uzorci imali najniže *BI*. Inkapsulacijom je ostvaren veći *BI* za UF (1,5 – 5,8 puta), UFL (1,6 – 3,9 puta) i UPA (1,1 – 2,8 puta) u odnosu na NIE, a povećanje je ovisilo o primijenjenom omotaču.

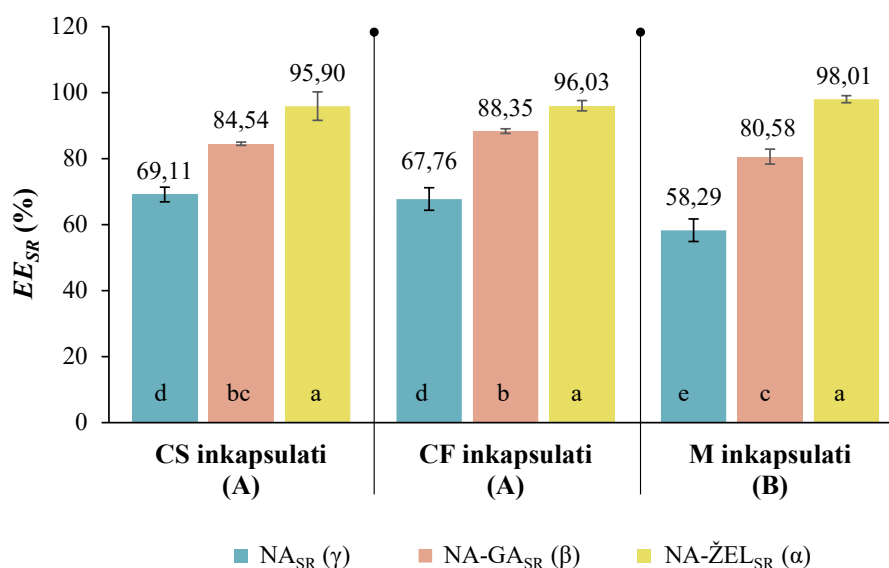
Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva pokazala je da je dominantni utjecaj na varijabilnost *BI* većine spojeva imao omotač dok je ekstrakt najviše utjecao na 3,4-dihidroksibenzojevu kiselinu, epikatehin i epikatehin galat. NA_{sz} inkapsulati rezultirali s *BI* vrijednostima većim za 1,2 – 10,3 puta u odnosu na NIE, NA-GA_{sz} inkapsulati za 1,2 – 8,8 puta te NA-ŽEL inkapsulati za 1,6 – 16,1 puta većim *BI* vrijednostima u odnosu na NIE. Dodavanje drugog omotača uz NA obično je povećavalo *BI* u odnosu na NA inkapsulate. Kombinacijom NA-ŽEL_{sz} najbolje su očuvane vanilinska i elaginska kiselina, katehin, epikatehin galat i galokatehin galat. NA-GA_{sz} kombinacija omotača bila je najučinkovitija za 3,4-dihidroksibenzojevu, siringinsku i *o*-kumarinsku kiselinu i procijanidin B2. Ovo potvrđuje da omotač, njegova kemijska priroda i kombinacija polimera igraju ključnu ulogu u modulaciji otpuštanja i biodostupnosti pojedinačnih fenolnih spojeva.

4.6. INKAPSULACIJA EKSTRAKATA TROPA GROŽĐA METODOM SUŠENJA RASPRŠIVANJEM

Ekstrakti tropa grožđa CS-NIE, CF-NIE i M-NIE inkapsulirani su metodom sušenja raspršivanjem pomoću tri odabrana omotača (NA_{sr}, NA-GA_{sr}, NA-ŽEL_{sr}). Određena je učinkovitost inkapsulacije sušenjem raspršivanjem (*EE*_{sr}) prema **izrazu (3.27)** te procijenjen utjecaj ekstrakta i omotača na svojstva dobivenih inkapsulata poput morfologije i amorfности, odnosno kristaličnosti. Nadalje, analiziran je udio otpuštenih fenolnih spojeva u pojedinim fazama probave tijekom *in vitro* simulirane probave bez prisustva enzima te *BI* fenolnih spojeva nakon simulirane probave ekstrakata i inkapsulata uz prisustvo enzima.

4.6.1. Učinkovitost inkapsulacije fenolnih spojeva sušenjem raspršivanjem za različite inkapsulate - utjecaj omotača i ekstrakta

Nakon inkapsulacije CS, CF i M ekstrakata tropa grožđa izračunata je *EE*_{sr}, a rezultati su prikazani na **Slici 4.29**.



Slika 4.29 Učinkovitost inkapsulacije sušenjem raspršivanjem (EE_{SR} , %) ekstrakata tropa grožđa bogatih fenolnim spojevima (CS, CF i M inkapsulati) korištenjem različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR} i NA-ŽEL_{SR}). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$.

Statistička analiza utjecaja omotača i ekstrakta (ANOVA faktorski test, $p < 0,05$) na EE_{SR} pokazuje da su oba faktora imala statistički značajan utjecaj na EE_{SR} te da je postojala statistički značajna interakcija između njih. Pri tome je najveći utjecaj na varijabilnost podataka imao faktor „omotač“ (91,6 % varijance), dok su faktor „ekstrakt“ i interakcija između faktora varijanci svih podataka doprinosili s 2,7 %, odnosno 3,5 % varijance (**Tablica 4.34**). Ponovo su kao i kod inkapsulacije ionskim geliranjem i inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem najviše vrijednosti EE_{SR} postignute uz primjenu omotača NA-ŽEL_{SR} (95,90 – 98,01 %) potom primjenom NA-GA_{SR} (80,58 – 88,35 %) te NA_{SR} (58,29 – 69,11 %). Vrijednosti za EE_{SR} kod inkapsulata koji su sadržavali ekstrakte CS i CF međusobno se nisu razlikovale te su u prosijeku imale veće vrijednosti EE_{SR} nego inkapsulati koji su sadržavali M ekstrakte (**Slika 4.29**).

Tablica 4.34 Faktorski ANOVA test za EE_{SR} - značajnost utjecaja omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije metodom sušenja raspršivanjem te te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

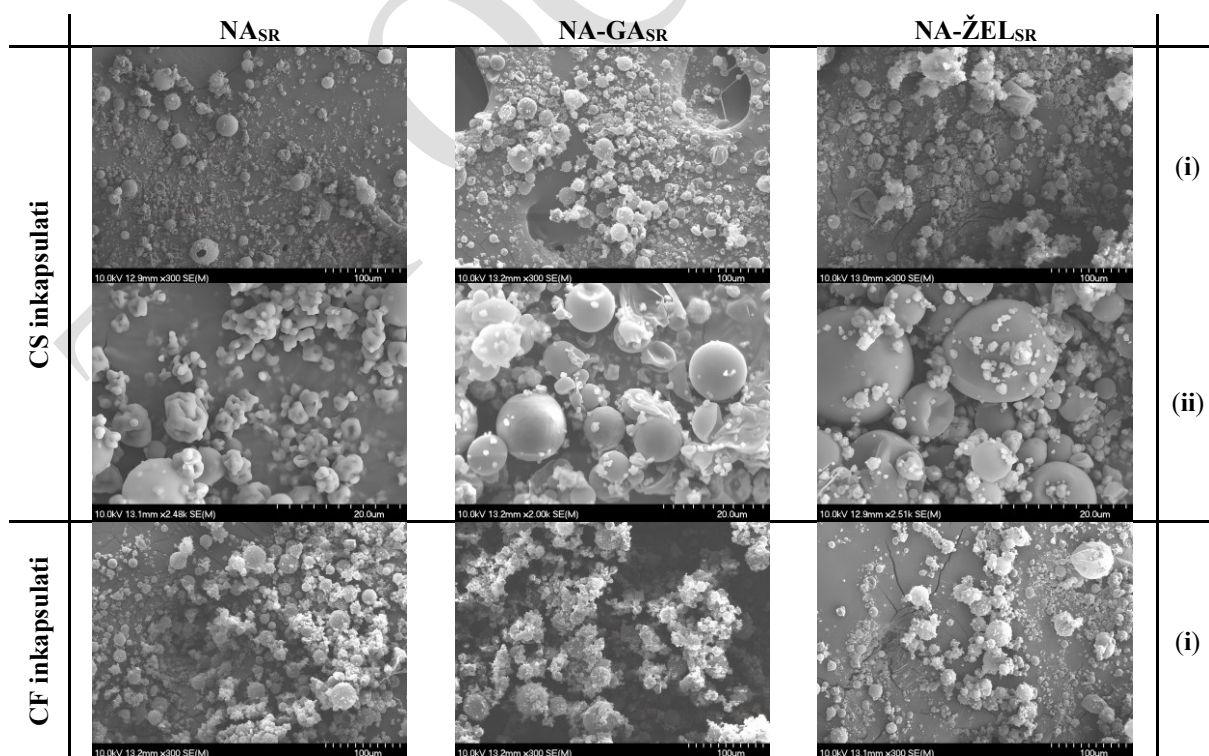
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Ekstrakt	133,3	2	66,6	10,66	0,0009 *	2,7 %
Omotač	4572,8	2	2286,4	365,71	0,0000 *	91,6 %
Ekstrakt × omotač	174,3	4	43,6	6,97	0,0014 *	3,5 %
Pogreška	112,5	18	6,3			

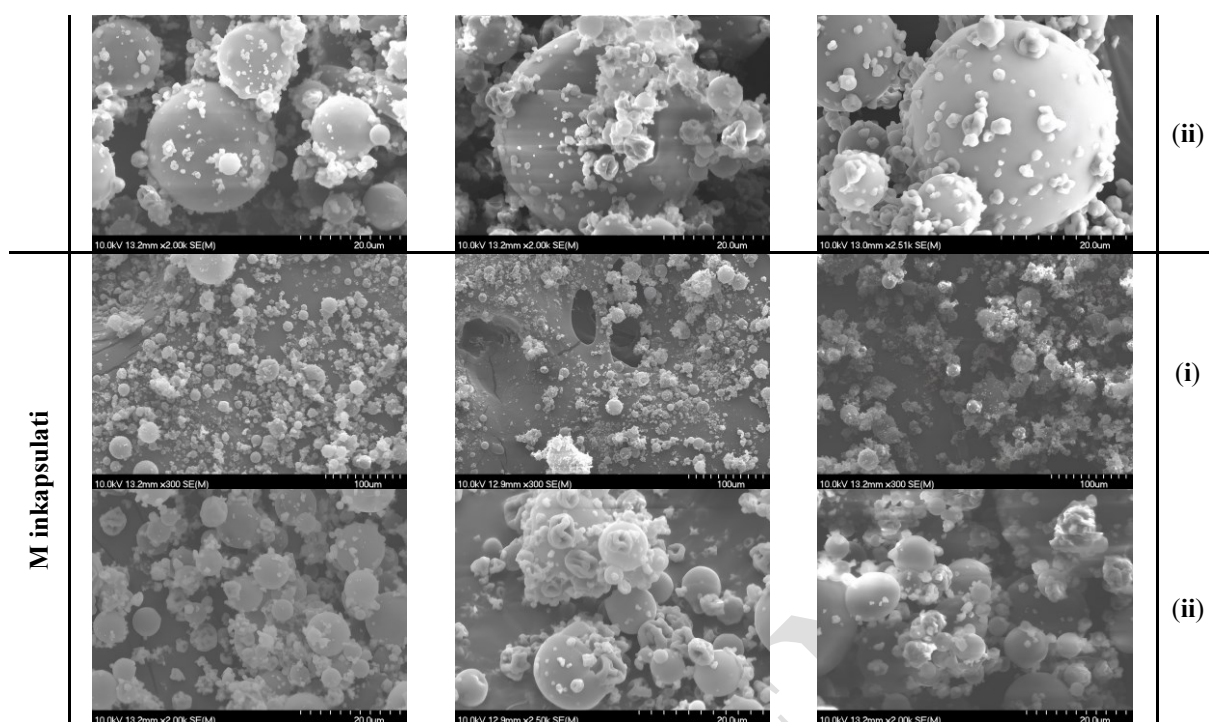
* statistički značajno uz $p < 0,05$

Ograničena učinkovitost NA_{SR} u ovom kontekstu mogla bi se povezati s manjom sposobnošću stvaranja stabilnih zaštitnih slojeva, što dovodi do većih gubitaka fenolnih spojeva tijekom procesa sušenja raspršivanjem. S druge strane, učinkovitost omotača $NA-\check{Z}EL_{SR}$ može se pripisati poboljšanim zaštitnim svojstvima i strukturnoj stabilnosti koja proizlazi iz ove kombinacije omotača. Song i sur. (2022) i Cortés-Morales i sur. (2021) opisali su sinergističke učinke kombiniranja proteina i polisaharida kao omotača što dovodi do veće EE zbog njihovih komplementarnih svojstava, odnosno proteini imaju stabilizirajuća svojstva i mogućnost stvaranja filma dok polisaharidi stvaraju gelove i pružaju zaštitu. Nadalje, GA je razgranati polisaharid koji poboljšava stabilnost emulzija i pruža umjerenu zaštitu od utjecaja okoline (Motlagh i sur., 2006; Murmu i Mishra, 2017). Iako je s omotačem $NA-GA_{SR}$ postignuta niža EE_{SR} u odnosu na $NA-\check{Z}EL_{SR}$, ipak je postignuto poboljšanje EE_{SR} u odnosu na primjenu samog NA_{SR} te bi primjena ovog omotača bi mogla biti izbor u situacijama kada su materijali na bazi proteina nepoželjni ili lošiji izbor za inkapsulaciju.

4.6.2. Morfologija različitih inkapsulata dobivenih metodom sušenja raspršivanjem

Ispitan je utjecaj korištenih omotača (NA_{SR} , $NA-GA_{SR}$, $NA-\check{Z}EL_{SR}$) na morfologiju CS, CF i M inkapsulata pomoću SEM-a, a dobivene slike su prikazane na Slici 4.30.





Slika 4.30. SEM slike CS, CF i M inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}). Slike su u mjerilu od 100 μm (i) i 20 μm (ii).

Iako NA_{SR} inkapsulati pokazuju uglavnom sferični oblik, njihovim detaljnijim analiziranjem uočava se varijacija veličine inkapsulata te površinske nepravilnosti što je vjerojatno povezano s agregacijom čestica tijekom procesa sušenja. Većina inkapsulata općenito je glatke površinske teksture s manjim udubljenjima ili naborima, posebno uočenim kod CS-NA_{SR} inkapsulata (**Slika 4.30, CS-NA_{SR}(ii)**), najvjerojatnije zbog gubitka vlage tijekom inkapsulacije ili uvjeta procesa inkapsulacije. Nadalje, može se uočiti i nakupljanje inkapsulata što su također uočili i drugi autori poput Tonon i sur. (2008) i Botrel i sur. (2014).

Primjena NA-GA_{SR} omotača rezultirala je ujednačenim oblikom inkapsulata kao što je vidljivo za CS-NA-GA_{SR} inkapsulate (**Slika 4.30, CS-NA-GA_{SR}(ii)**). Površina NA-GA_{SR} inkapsulata može biti hrapavija (kao što se vidi kod M-NA-GA_{SR} inkapsulata na **Slici 4.30 M-NA-GA_{SR}(ii)**), zahvaljujući svojstvima GA, poznate po svojstvima emulgiranja i stvaranja filma koje povećavaju stabilnost čestica, smanjujući srastanje čestica. Kombinacija NA-GA osigurava matriks za inkapsulaciju koji je puno kohezivniji od primjerice NA-ŽEL kombinacije i stoga omogućuje bolje odvajanje između čestica; općenito, omogućuje učinkovitiju inkapsulaciju. Nasuprot tome, NA-ŽEL daje inkapsulate koji zadržavaju općenito sferični oblik, ali s nekim nepravilnostima koje se vide kod inkapsulata CS-NA-ŽEL_{SR} (**Slika 4.30 CS-NA-ŽEL_{SR}(ii)**). Ove nepravilnosti mogu biti posljedica manje krutosti ŽEL u usporedbi s GA, što dovodi do povećane varijabilnosti površine inkapsulata. Unatoč tome, ŽEL ima druge prednosti kao što je

poboljšanje biodostupnosti i kontrolirano otpuštanje inkapsuliranih tvari (Wang i sur., 2016).

Tablica 4.35 ilustrira varijacije u distribuciji veličine čestica različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem.

Tablica 4.35 Srednji promjer ($\pm$ SD) i raspodjela veličine čestica (D10, D50, D90) CS, CF i M inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem pomoću omotača NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}

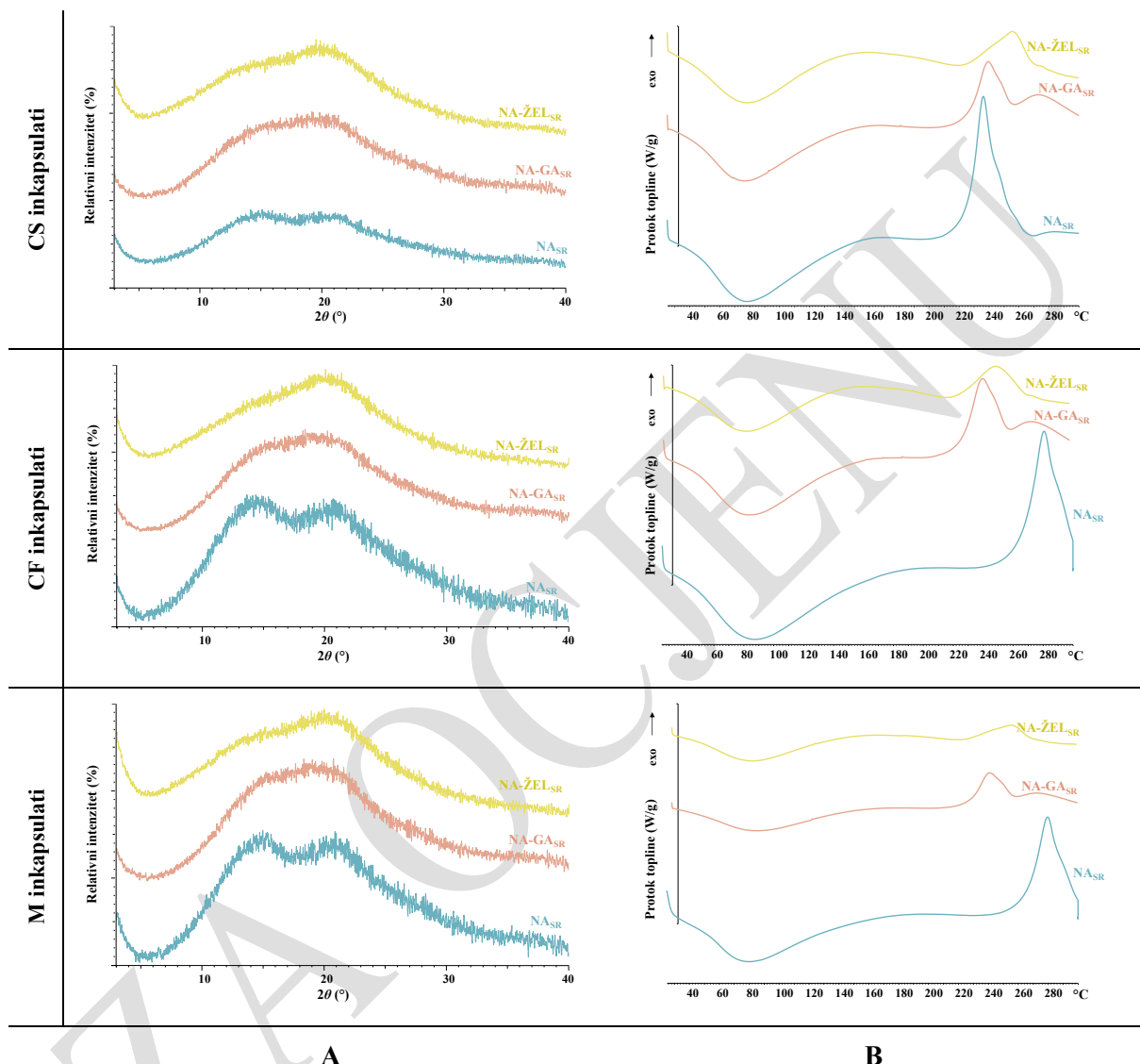
Ekstrakt	Inkapsulati	Promjer (μ m)	D10 (μ m)	D50 (μ m)	D90 (μ m)	Raspon (μ m)
CS	NA _{SR}	3,96 $\pm$ 2,20	2,08	3,03	6,95	1,97–11,98
	NA-GA _{SR}	2,61 $\pm$ 1,73	1,25	1,95	5,36	1,19–10,69
	NA-ŽEL _{SR}	2,62 $\pm$ 1,91	1,24	1,82	5,35	1,18–12,02
CF	NA _{SR}	4,29 $\pm$ 2,26	2,10	3,46	7,37	1,97–11,90
	NA-GA _{SR}	2,59 $\pm$ 1,71	1,24	1,82	5,51	1,18–10,08
	NA-ŽEL _{SR}	2,58 $\pm$ 1,81	1,24	1,87	5,21	1,18–12,17
M	NA _{SR}	2,82 $\pm$ 2,12	1,24	1,95	5,81	1,19–12,23
	NA-GA _{SR}	2,53 $\pm$ 1,69	1,24	1,86	4,94	1,18–11,56
	NA-ŽEL _{SR}	2,38 $\pm$ 1,72	1,18	1,67	4,57	1,18–12,31

CS-NA_{SR} inkapsulati imali su najveći raspon veličina (1,97 – 11,98 μ m) i najveći srednji promjer (3,96 μ m). Distribucija veličine naznačena je vrijednostima D10, D50 i D90 (2,08 μ m, 3,03 μ m i 6,95 μ m). S druge strane, CS-NA-GA_{SR} i CS-NA-ŽEL_{SR} inkapsulati imali su manji srednji promjer od 2,61 μ m odnosno 2,62 μ m. Distribucija veličine čestica CS-NA-GA_{SR} i CS-NA-ŽEL_{SR} bila je dosljednija i vidljivi su manji rasponi (1,19 – 10,69 μ m za CS-NA-GA_{SR} i 1,18 – 12,02 μ m za CS-NA-ŽEL_{SR}). Isti je obrazac distribucije čestica je utvrđen i kod CF inkapsulata. CF-NA_{SR} inkapsulati imali su najveći srednji promjer od 4,29 μ m i najširi raspon veličina (1,97 – 11,90 μ m), s vrijednostima D10, D50 i D90 od 2,10 μ m, 3,46 μ m i 7,37 μ m. Srednji promjeri CF-NA-GA_{SR} (2,59 μ m) i CF-NA-ŽEL_{SR} (2,58 μ m) inkapsulata bili su niži, s manjim rasponima veličina od 1,18 – 10,08 μ m odnosno 1,18 – 12,17 μ m. Od svih inkapsulata, M inkapsulati bili su najmanji. M-NA_{SR} inkapsulati imali su prosječni promjer od 2,82 μ m i raspon veličine od 1,19 do 12,23 μ m. Vrijednosti D10, D50 i D90 (1,24 μ m, 1,95 μ m i 5,81 μ m) pokazale su širok raspon veličina. S druge strane, M-NA-GA_{SR} i M-NA-ŽEL_{SR} inkapsulati pokazali su manje raspone (1,18 – 11,56 μ m za M-NA-GA_{SR} i 1,18–12,31 μ m za M-NA-ŽEL_{SR}), s manjim srednjim promjerima od 2,53 μ m odnosno 2,38 μ m. M-NA-ŽEL_{SR} inkapsulati imali su najveću homogenost i najužu distribuciju (D10 – D90: 1,18 – 4,57 μ m).

4.6.3. Termofizikalna analiza različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem

CS, CF i M inkapsulati proizvedeni metodom sušenja raspršivanjem analizirani su radi utvrđivanja njihovog kristalnog, odnosno amorfnog stanja primjenom XRPD i DSC analiza

(Slika 4.31). Rezultati XRPD i DSC analiza ekstrakata i korištenih omotača detaljno su prikazani i obrađeni u poglavlju 4.4.3.3 gdje je na osnovi XRPD analize zaključeno da svi ispitani ekstrakti imali kristalnu strukturu, a omotači amorfnu strukturu, što je dodatno potvrđeno rezultatima DSC analize.



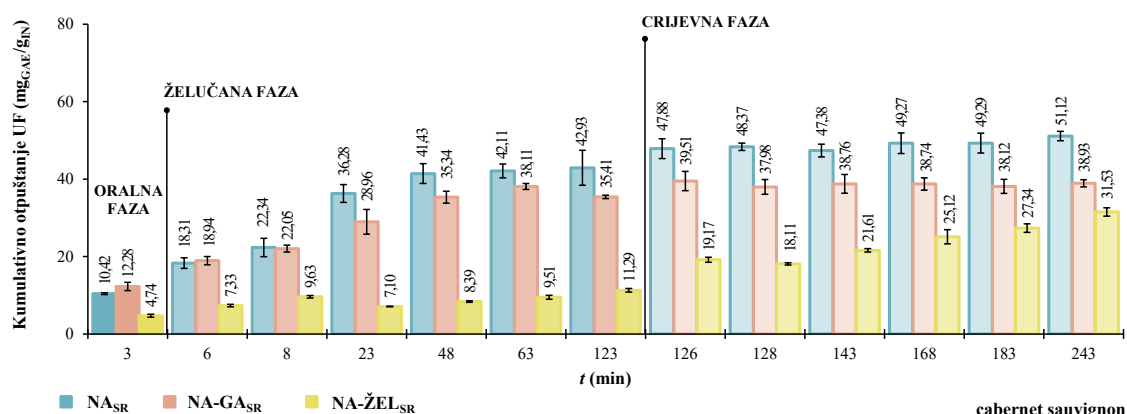
Slika 4.31 XRPD difraktogrami (A) i DSC termogrami (B) CS, CF i M inkapsulata pripremljenih sušenjem raspršivanjem s omotačima: NA-SR, NA-GA-SR, NA-ŽEL-SR

NA-GA-SR i NA-ŽEL-SR inkapsulati pokazuju sličnije difrakcijske obrasce za sve ispitane inkapsulate u usporedbi sa NA-SR. Intenziteti vrhova svih inkapsulata variraju između 10° i 30°, što se može pripisati manjim interakcijama između ekstrakta i cjelokupnog matriksa inkapsulata (Slika 4.31 A). DSC termogrami (Slika 4.31 B) prikazuju dehidracijski pik, sličan onome u termogramima korištenih omotača (Slika 4.13 B), nakon čega slijedi prijelazna toplinska faza. Oštri prijelazi pri višim temperaturama mogu ukazivati na interakcije između omotača i

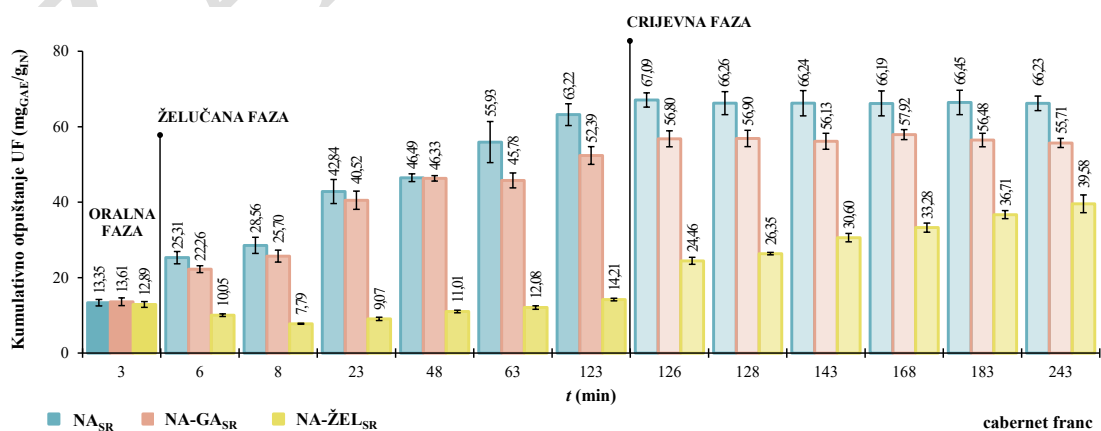
fenolnih spojeva iz ekstrakata tropa grožđa. Čini se da jednostavniji polisaharidni omotači, poput NA_{SR} , u inkapsulatima pokazuju oštrije prijelaze u DSC analizi zbog veće toplinske degradacije, dok širi prijelazi vidljivi kod $NA-GA_{SR}$ i $NA-ŽEL_{SR}$ ukazuju na blago povećanje toplinske stabilnosti u usporedbi sa NA_{SR} . Barra i sur. (2019) tumače tu pojavu kao dokaz sporije degradacije ili složenijih interakcija omotača s inkapsuliranim materijalom.

4.6.4. Profil i kinetika otpuštanja ukupnih fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem

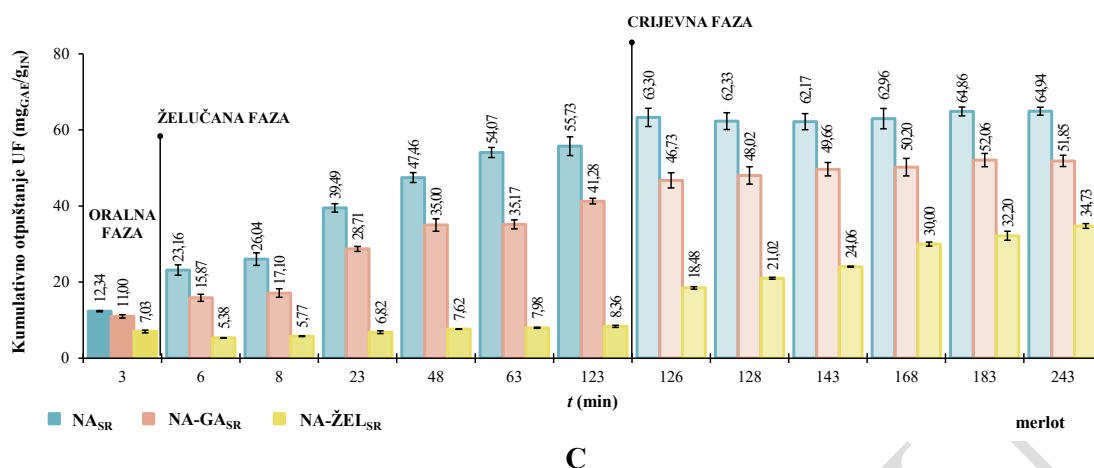
Profil kumulativnog otpuštanja UF-a iz CS, CF i M inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanje pomoću omotača (NA_{SR} , $NA-GA_{SR}$, $NA-ŽEL_{SR}$) praćen je kroz tri faze simulirane probave (OP, GP i IP) bez prisustva enzima u ukupnom trajanju 243 minute, a rezultati su prikazani na **Slici 4.32 A-C**. Udio otpuštenih UF-a u svakoj fazi probave od ukupno otpuštenih UF-a nakon kompletne probave prikazan je **Slikom 4.33**.



A

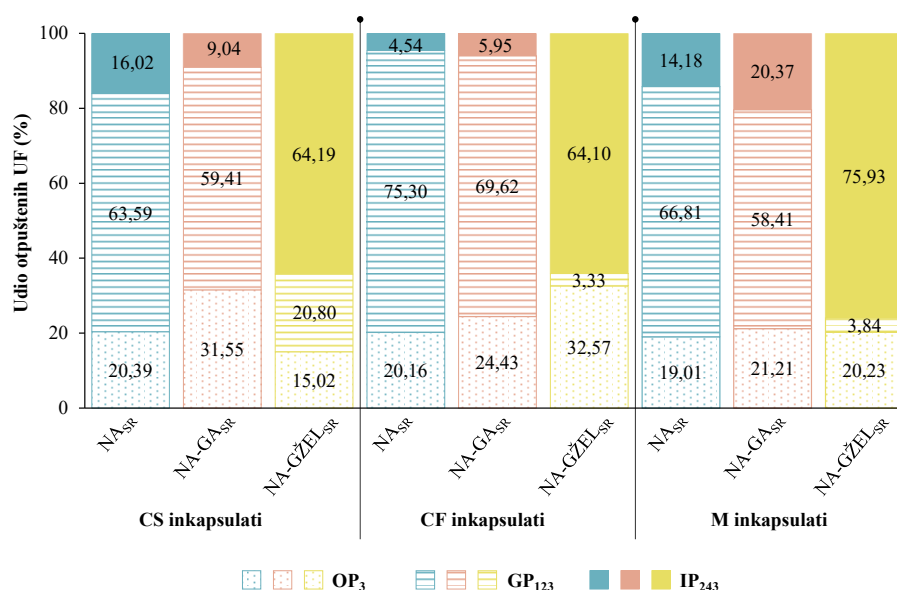


B



Slika 4.32 Kumulativno otpuštanje UF-a iz CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata (IN u mjernoj jedinici) dobivenih inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem (SR u indeksu) pomoću omotača NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}

Profil kumulativnog otpuštanja UF-a iz svih inkapsulata koji sadrže CS, CF i M ekstrakte jasno prati određeni obrazac otpuštanja kroz sve probavne faze, kako je prikazano na **Slikama 4.32 i 4.33**. NA_{SR} inkapsulati pokazuju početno otpuštanje UF-a već u OP, s vrijednostima između 10,42 mg_{GAE}/g_{IN} i 13,35 mg_{GAE}/g_{IN}, što ukazuje na brzo početno oslobađanje (**Slika 4.32 A – C**). Ovo inicijalno otpuštanje vjerojatno je posljedica fenolnih spojeva koji su apsorbirani na površini inkapsulata i nisu potpuno ugrađeni u njihovu strukturu (matriks), što ih čini podložnima brzom otpuštanju. Tijekom GP, kumulativno otpuštanje iz NA_{SR} inkapsulata pokazuje značajan porast dosežući vrijednosti 18,31 – 42,93 mg_{GAE}/g_{IN} za CS inkapsulate; 25,31 – 63,22 mg_{GAE}/g_{IN} za CF inkapsulate te 23,16 – 55,73 mg_{GAE}/g_{IN} za M inkapsulate. U IP udio otpuštenih UF-a bio je nešto viši u odnosu na završetak GP faze i kretao se na kraju IP faze između 51,12 mg_{GAE}/g_{IN} i 66,23 mg_{GAE}/g_{IN}, što ukazuje na ograničenu mogućnost zaštite UF-a ovim omotačem u ranijim fazama probave (**Slika 4.32 A – C**). Ovo najbolje prikazuje **Slika 4.33** gdje je vidljivo da je najveće oslobađanje UF-a iz NA_{SR} uočeno u GP (63,59 – 75,30 %), gdje bi korišteni omotač trebao omogućiti najveću zaštitu inkapsuliranih bioaktivnih spojeva.



Slika 4.33 Udio otpuštenih UF-a iz CS, CF i M inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) na kraju svake gastrointestinalne faze: OP₃ – oralne faze, GP₁₂₃ – želučane faze, IP₂₄₃ – crijevne faze (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave)

Kada je korišten omotač NA-GA_{SR}, otpuštanje UF-a u OP pokazuje slične kumulativne vrijednosti za sve inkapsulate, krećući se u rasponu od 11,00 mg_{GAE}/g_{IN} do 13,61 mg_{GAE}/g_{IN} (Slika 4.32 A – C). Tijekom GP otpuštanje je bilo značajnije, te su se vrijednosti otpuštenih UF-a na kraju GP faze svih inkapsulata kretale u rasponu 35,41 – 52,39 mg_{GAE}/g_{IN} (Slika 4.32 A – C) ili 58,41 – 69,62 % (Slika 4.33). U IP fazi nastvilo se blago otpuštanje UF-a pri čemu su se kumulativne vrijednosti UF-a na kraju ove faze kretale između 38,93 mg_{GAE}/g_{IN} i 55,71 mg_{GAE}/g_{IN} (Slika 4.32) odnosno 5,95 – 20,37 % (Slika 4.33). Sveukupno, NA_{SR} i NA-GA_{SR} inkapsulati slijedili su sličan trend otpuštanja, ali NA-GA_{SR} pokazuju nešto bolju zaštitu UF-a u GP fazi što se očitovalo njihovim slabijim otpuštanjem u ovoj fazi. Ova razlika može se pripisati stabilizirajućim učincima GA, koja poboljšava integritet NA-GA_{SR} i stabilnost UF-a, osobito u ranim fazama probave, u usporedbi sa NA_{SR} inkapsulatima.

Nasuprot tome, NA-ŽEL_{SR} inkapsulati pokazuju izrazito specifičan obrazac otpuštanja odnosno otpuštanje UF-a iz ovih inkapsulata bilo je slabije tijekom OP (4,74 – 12,89 mg_{GAE}/g_{IN}) i GP (8,36 – 14,21 mg_{GAE}/g_{IN}) u odnosu na NA_{SR} i NA-GA_{SR} inkapsulate (Slika 4.32 A – C). Ovakve vrijednosti otpuštanja UF-a mogu se povezati s manjim udjelom površinski prisutnih fenolnih spojeva kod NA-ŽEL_{SR} inkapsulata u usporedbi s NA_{SR} i NA-GA_{SR} što odgovara nižem početnom otpuštanju u oralnim uvjetima. S druge strane, u GP je vidljivo produženo otpuštanje UF-a što sugerira da NA-ŽEL_{SR} zadržava dobru zaštitu UF-a u želudcu kao i u ustima sprječavajući njihovu brzu razgradnju ili otpuštanje dok omogućuje kontrolirano i postupno

otpuštanje iz matriksa inkapsulata. U IP dolazi do značajnog porasta otpuštanja UF-a, s kumulativnim vrijednostima koje dosežu 31,53 – 39,58 mg_{GAE}/g_{IN} (Slika 4.32 A-C), što odgovara 64,10 – 75,93 % UF-a (Slika 4.33). Želatina bubri ili se djelomično otapa pod neutralnim do blago alkalnim pH u uvjetima faze tankog crijeva, čime značajno povećava difuziju i oslobađanje UF-a. Ovo intenzivno otpuštanje u IP fazi ukazuje na visoku osjetljivost omotača NA-ŽEL_{SR} na pH uvjete koji prevladavaju u uvjetima IP pri čemu želatina postaje propusnija i omogućuje ciljano otpuštanje UF-a na optimalnom mjestu apsorpcije (Anirudhan i Mohan, 2014).

Kinetika otpuštanja UF-a iz inkapsulata procijenjena je primjenom različitih matematičkih modela, uključujući model prvog reda, Higuchijev model, Hixson-Crowellov model i Korsmeyer-Peppasov model čiji je grafički prikaz dostupan u Prilozima (Slika P3.1). Parametri modela, uključujući konstante brzine otpuštanja (k) i eksponent difuzije (n) za Korsmeyer-Peppasov model, kao i statistički kriteriji za procjenu prikladnosti modela, sažeti su u Tablici 4.36. Među korištenim statističkim parametrima, prilagođeni koeficijent determinacije (R^2_{adj}), Akaike informacijski kriterij (AIC) i kriterij odabira modela (MSC) identificirani su kao ključni kriteriji za odabir modela koji najbolje opisuje eksperimentalne podatke, a detaljno su opisani u poglavlju 4.4.2.5.

Tablica 4.36 Procijenjeni parametri primijenjenih matematičkih modela za opisivanje kinetike otpuštanja UF-a (k_1 , k_H , k_{HC} , k_{KP} – konstante otpuštanja za odgovarajući model; n – eksponent difuzije) iz CS, CF i M inkapsulata pripremljenih sušenjem raspršivanjem s različitim omotačima (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) te statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela (R^2_{adj} – prilagođeni koeficijent determinacije, AIC – Akaike informacijski kriterij, MSC – kriterij odabira modela)

Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela										
Matematički modeli		CS inkapsulati			CF inkapsulati			M inkapsulati		
		NA _{SR}	NA-GA _{SR}	NA-ŽEL _{SR}	NA _{SR}	NA-GA _{SR}	NA-ŽEL _{SR}	NA _{SR}	NA-GA _{SR}	NA-ŽEL _{SR}
Model prvog reda	R^2_{adj}	0,855	0,779	0,784	0,937	0,916	0,759	0,929	0,899	0,765
	AIC	123,918	130,018	128,235	113,001	117,112	131,785	114,313	119,575	133,050
	MSC	1,421	0,813	1,225	2,272	1,921	1,115	2,140	1,846	1,198
	k_1	0,031	0,041	0,008	0,042	0,042	0,010	0,036	0,029	0,009
Higuchi model	R^2_{adj}	0,707	0,418	0,852	0,788	0,693	0,833	0,806	0,887	0,801
	AIC	135,664	145,806	122,179	132,628	138,007	125,930	130,329	121,545	130,400
	MSC	0,687	-0,174	1,603	1,046	0,615	1,481	1,139	1,723	1,363
	k_H	8,034	8,588	5,537	8,354	8,543	5,849	8,081	7,776	5,438
Hixson-Crowell model	R^2_{adj}	0,679	0,362	0,721	0,744	0,639	0,727	0,772	0,816	0,721
	AIC	137,111	147,195	132,287	135,667	140,634	133,734	132,901	129,430	135,799
	MSC	0,596	-0,261	0,971	0,856	0,451	0,993	0,979	1,230	1,026
	k_{HC}	0,006	0,007	0,003	0,007	0,007	0,003	0,007	0,006	0,003

Konstante brzine otpuštanja i statistički kriteriji uspješnosti aproksimacije modela										
Matematički modeli		CS inkapsulati			CF inkapsulati			M inkapsulati		
		NA _{SR}	NA-GA _{SR}	NA-ŽEL _{SR}	NA _{SR}	NA-GA _{SR}	NA-ŽEL _{SR}	NA _{SR}	NA-GA _{SR}	NA-ŽEL _{SR}
Korsmeyer-Peppas model	R ² _{adj}	0,913	0,886	0,741	0,872	0,873	0,688	0,939	0,974	0,652
	AIC	117,081	119,646	132,021	122,718	122,287	136,782	112,575	98,676	140,272
	MSC	1,848	1,461	0,988	1,665	1,598	0,803	2,249	3,152	0,746
	k _{KP}	20,189	35,888	10,596	18,357	26,022	12,519	21,047	17,533	7,605
	n	0,319	0,204	0,341	0,356	0,272	0,313	0,316	0,335	0,391

Podebljano su označeni statistički kriteriji modela koji najbolje opisuju otpuštanje UFT iz pojedinih inkapsulata

Tablica 4.36 pokazuje da Korsmeyer-Peppasov empirijski model najbolje opisivao kinetiku otpuštanja UF-a iz NA_{SR} i NA-GA_{SR} inkapsulata za CS i M ekstrakte ($R^2_{adj} > 0,89$). Ovaj model je dovoljno fleksibilan da obuhvati složene obrasce otpuštanja, što je potvrđeno u brojnim istraživanjima, uključujući istraživanja Korsmeyer i sur. (1983), Costa i Sousa Lobo (2001) te Siepmann i Siepmann (2008). Međutim, na temelju grafičkog prikaza (**Slika P3.1**), otpuštanje UF-a iz ovih inkapsulata bolje odgovara modelu prvog reda. Ovaj model, kao mehanistički model, točnije opisuje opaženu kinetiku otpuštanja. Unatoč tome, eksponent difuzije n dobiven za NA_{SR} i NA-GA_{SR} inkapsulate $\leq 0,45$ ukazuje da je Fickova difuzija glavni mehanizam otpuštanja UF-a (**Tablica 4.36**). Za CF inkapsulate model prvog reda dao je najviše R^2_{adj} vrijednosti: 0,937 za NA_{SR} i 0,916 za NA-GA_{SR}. Ovi rezultati, u skladu su s grafičkim prikazima (**Slika P3.1**) i ukazuju da model prvog reda učinkovito opisuje kinetiku otpuštanja UF-a iz svih NA_{SR} i NA-GA_{SR} inkapsulata.

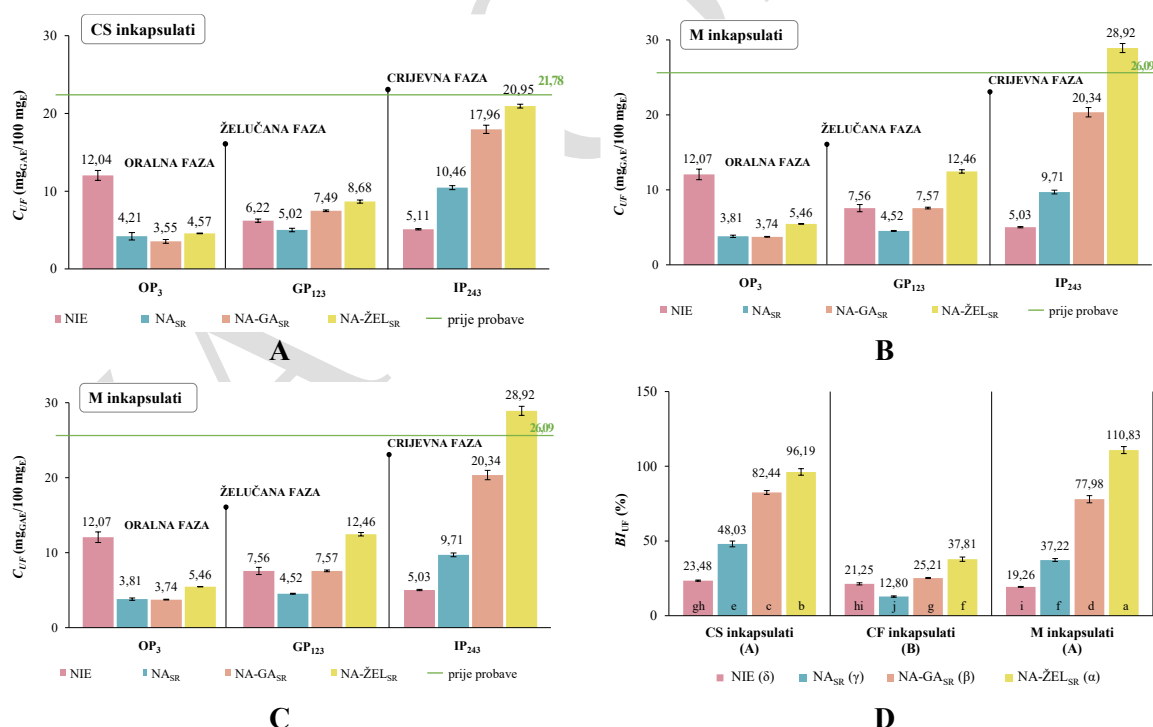
Iz **Slike P3.1 u Prilozima** vidljivo je da profil otpuštanja iz NA-ŽEL_{SR} inkapsulata značajno odstupa od profila NA_{SR} i NA-GA_{SR} te ga nije moguće u potpunosti opisati niti jednim od ispitivanih modela. Ipak, Higuchijev model pruža najbolje statističke parametre za aproksimaciju podataka, s R^2_{adj} vrijednostima u rasponu od 0,801 do 0,852 (**Tablica 4.36**). Ovaj profil otpuštanja fenolnih spojeva može se podijeliti u tri faze: prva faza karakterizirana je inicijalnim povećanjem, nakon čega slijedi smanjenje otpuštanja UF-a; druga faza pokazuje stacionarno otpuštanje UF-a tijekom GP, dok treća faza uključuje postupno povećanje otpuštanja UF-a u fazi tankog crijeva. Ovakav trend otpuštanja UF-a ukazuje na izrazitu osjetljivost NA-ŽEL_{SR} inkapsulata na pH uvjete koji utječu na otpuštanje. Promjene u pH vrijednosti tijekom probavnih faza vjerojatno utječu na strukturne karakteristike želatine, čime se modulira otpuštanje fenolnih spojeva.

4.6.5. Biodostupnost fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem - utjecaj omotača i ekstrakta

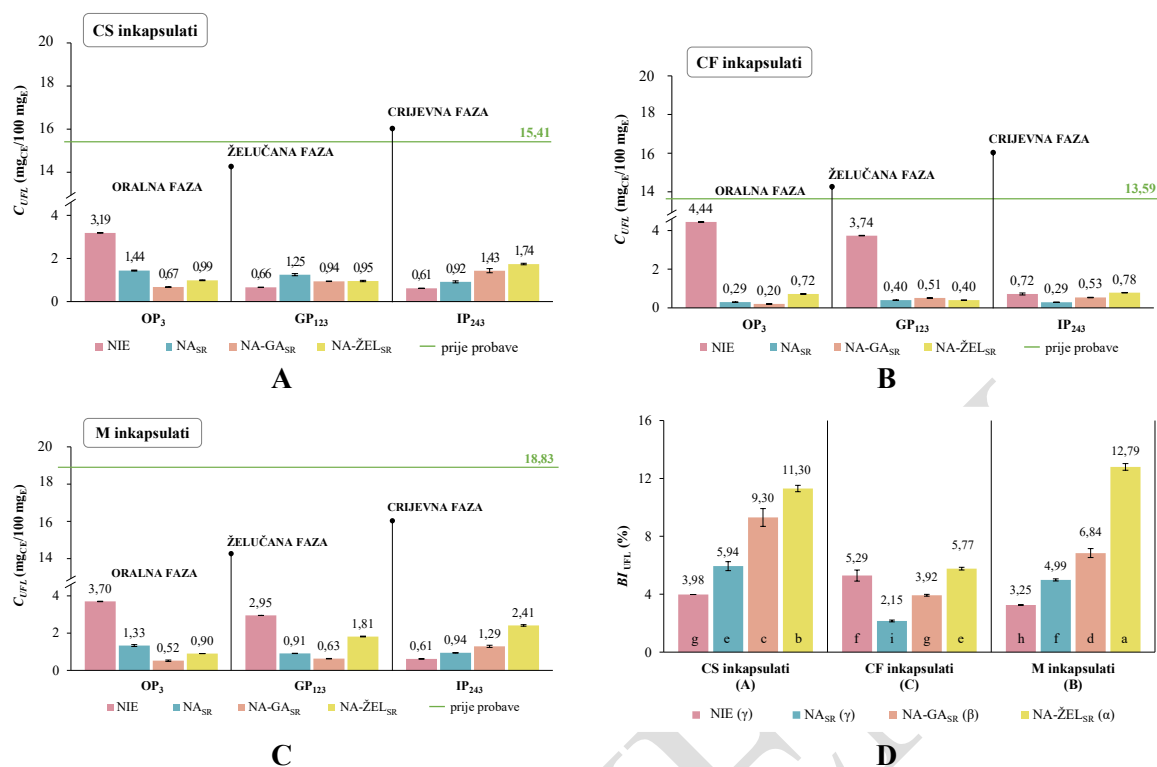
Simulirana probava *in vitro* s probavnim enzimima, provedena je na CS-NIE, CF-NIE i M-NIE kao i na njihovim inkapsulatima dobivenim sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) prema istom protokolu kao kod inkapsulacije ionskim geliranjem i sušenjem zamrzavanjem. Praćen je profil otpuštanja UF-a, UFL-a i UPA i pojedinačnih fenolnih spojeva tijekom OP, GP i IP faze probave u ovisnosti o primijenjenom ekstraktu i omotaču u inkapsulatima te je izračunat *BI* za navedene fenolne spojeve prema izrazu (3.31). Udio fenolnih spojeva potreban za izračunavanje *BI* vrijednosti u NIE uzorcima prije probave prikazan je na Slici 4.2 i Tablici 4.3.

4.6.5.1. Biodostupnost ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

Maseni udio kumulativno otpuštenih fenolnih spojeva iz ekstrakata i njihovih inkapsulata u probavne tekućine na kraju OP, GP i IP faze te vrijednosti *BI* za fenolne spojeve nakon simulirane probave ispitivanih uzoraka prikazani su na Slikama 4.34 – 4.36(A – D).



Slika 4.34 Maseni udio UF-a (C_{UF} , mg_{GAE}/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UF-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) te indeks biodostupnosti (*BI*) UF-a ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$



Slika 4.35 Maseni udio UFL-a (C_{UFL} , mg_{CE}/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UFL-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) te indeks biodostupnosti (BI) UFL-a ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$

Kao što je ranije navedeno (poglavlja 4.4.4.1 i 4.5.4.1) udio otpuštenih UF-a iz NIE uzoraka bio je najveći u OP fazi, a potom se smanjivao prema IP fazi. Suprotno NIE, udio otpuštenih UF-a u OP fazi iz svih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem bio je najniži te se povećavao prema GP te dalje prema IP fazi gdje je maseni udio UF-a bio veći za 2,1 – 2,7 puta u odnosu na GP. Osim toga u OP fazi otpušteno je manje UF-a (2,2 – 14,0 puta) iz inkapsulata u odnosu na NIE. Nadalje, u GP fazi uočava se niži udio otpuštenih UF-a iz svih NA_{SR} inkapsulata te CF-NA-GA_{SR} i CF-NA-ŽEL_{SR} u odnosu na NIE dok je taj udio bio viši u slučaju CS i M inkapsulata pripremljenih s omotačima NA-GA_{SR} i NA-ŽEL_{SR} u odnosu na NIE. U IP fazi udio otpuštenih UF-a je bio veći u odnosu na NIE (1,2 – 5,7 puta) s izuzetkom za CF-NA_{SR} inkapsulate kod kojih je udio otpuštenih UF-a bio niži u odnosu na NIE (Slika 4.34 A – C). Kao što su opisali De Vos i sur. (2010) te Grgić i sur. (2020), cilj inkapsulacije fenolnih spojeva je minimizirati otpuštanje u oralnoj fazi te u kiselom želučanom okruženju kako bi se bioaktivne tvari očuvale od razgradnje za kasniju potencijalnu apsorpciju u crijevima. Ovaj učinak

potvrđuje i produljeno otpuštanje UF-a iz CF inkapsulata tijekom GP u odnosu na OP (**Slika 4.34 B**).

Navedeni rezultati upućuju na činjenicu da je inkapsulacija sušenjem raspršivanjem poboljšala stabilnost UF-a tijekom ranijih faza probave te biodostupnost UF-a nakon probave, što je potvrđeno višim vrijednostima *BI* (1,2 – 5,8 puta) kod većine inkapsulata (osim CF-NA_{SR}) u odnosu na NIE. Prema faktorskom ANOVA testu (**Tablica 4.37**) oba faktora (omotač i ekstrakt) imali su značajan utjecaj na *BI* UF-a iz inkapsulata pripremljenih sušenjem raspršivanjem te postoji statistički značajna interakcija između faktora (15,1 % varijance svih podataka). Pri tome utjecaj faktora „omotač“ bio najizraženiji s obzirom na varijabilnost podataka (54,4 % varijance) pri čemu se su najveće *BI* vrijednosti UF-a (37,8 % do 110,8 %) zabilježene kod NA-ŽEL_{SR} inkapsulata dok se *BI* za NA-GA_{SR} kretao u rasponu 25,2 – 82,4 %, a za NA_{SR} inkapsulate od 12,8 % do 48,0 % (**Slika 4.34 D**). Varijabilnost vrijednosti *BI* UF-a s obzirom na korištene ekstrakte doprinosili su varijanci s 30,4 % pri čemu nije bilo statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti *BI* za CS i M inkapsulate, dok je srednja vrijednost podataka za *BI* UF-a za CF inkapsulate bila niža i statistički različita od prihodne dvije grupe inkapsulata.

Tablica 4.37 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UF-a - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije sušenjem raspršivanjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	20341,37	3	6780,46	3185,70	0,0000 *	54,4 %
Ekstrakt	11357,24	2	5678,62	2668,02	0,0000 *	30,4 %
Omotač × ekstrakt	5658,30	6	943,05	443,08	0,0000 *	15,1 %
Pogreška	51,08	24	2,13			

* statistički značajno uz $p < 0,05$

Tijekom OP, udio otpuštenih UFL iz svih inkapsulata bilo je značajno niži (2,2 – 15,2 puta kod NA_{SR}; 4,7 – 22,1 puta kod NA-GA_{SR} i 3,2 – 6,2 puta kod NA-ŽEL_{SR}) u usporedbi s NIE, koji su pokazali otpuštanje u rasponu od 3,19 do 4,44 mg_{CE}/100 mg_E za sve ekstrakte (**Slika 4.35 A–C**). Ovo niže otpuštanje flavonoida iz inkapsulata tijekom OP korisno je, jer omogućuje očuvanje flavonoida u ranoj fazi probav i potencijalno bolje otpuštanje u IP fazi, gdje se primarno odvija apsorpcija (Hollman, 2004; Kumar i Pandey, 2013; Thilakarathna i Rupasinghe, 2013). Tijekom GP, u NIE uzorcima određene su manje koncentracije UFL-a u odnosu na OP, što je također uočeno kod CS-NA_{SR} i M-NA_{SR} inkapsulata te CS-NA-ŽEL_{SR} i CF-NA-ŽEL_{SR} inkapsulata (**Slika 4.35 A–C**). U GP, iz CF i M inkapsulata otpušteno je manje

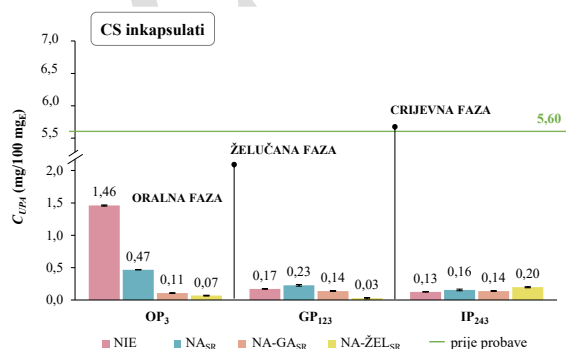
UFL-a u usporedbi s NIE (Slika 4.35 B i C). Budući da su flavonoidi osjetljivi na razgradnju u kiselom okruženju želuca, ovo ograničeno otpuštanje dodatno naglašava zaštitnu ulogu inkapsulata. U IP, otpuštanje UFL-a značajno se povećalo kod inkapsuliranih uzoraka, koji su većinom nadmašili NIE (1,1 do 3,9 puta) (Slika 4.35 A–C), osim kod CF-NA_{SR} i CF-NA-GA_{SR} inkapsulata (Slika 4.35 B). Ovo povećano otpuštanje u IP odrazilo se i na vrijednosti *BI* prikazane na Slici 4.35 D).

Ponovo je faktorski ANOVA test (Tablica 4.38, Slika 4.35) potvrdio značajan utjecaj oba faktora (omotač i ekstrakt) na *BI* UFL-a kod inkapsulacije sušenjem raspršivanjem uz statistički značajnu interakciju između faktora. Pri tome utjecaj faktora „omotač“ imao najveći utjecaj na varijabilnost svih podataka (55,5 % varijance) uz najveće vrijednost *BI* UFL kod inkapsulata kod kojih je kao omotač korištena kombinacija NA-ŽEL_{SR} (5,8 – 12,8 %), potom kombinacija omotača NA-GA_{SR} (3,9 – 9,3 %), dok nije uočena statistički značajna razlika između *BI* za UFL kod NA_{SR} inkapsulata i NIE (*BI* = 3,2 – 5,3 %). Biodostupnost UFL-a bila je najveća kod CS ekstrakta, potom M, a najmanja kod CF ekstrakta. Varijabilnosti *BI* vrijednosti za UFL s obzirom na korišteni ekstrakt te interakciju između omotača i ekstrakta podjednako su doprinosile varijanci s 21,4 %, odnosno 22,7 %.

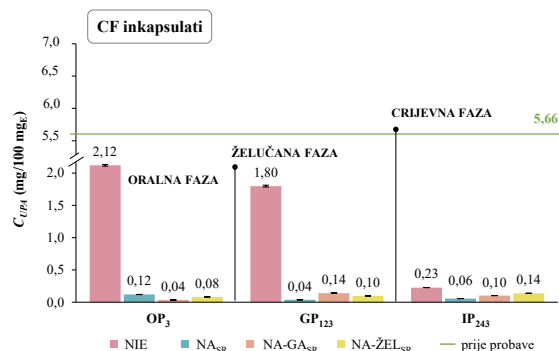
Tablica 4.38 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UFL-a - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije sušenjem raspršivanjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	196,152	3	65,384	927,67	0,0000 *	55,5 %
Ekstrakt	75,442	2	37,721	535,19	0,0000 *	21,4 %
Omotač × ekstrakt	80,040	6	13,340	189,27	0,0000 *	22,7 %
Pogreška	1,692	24	0,070			

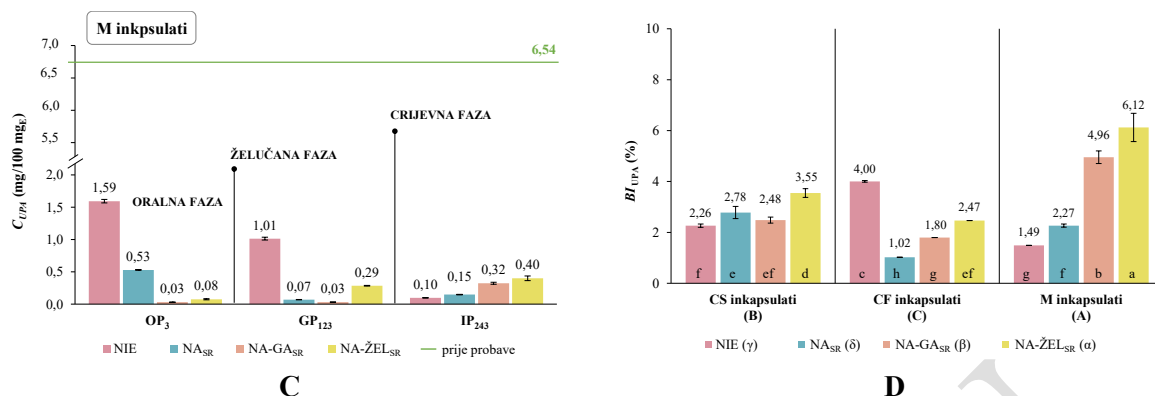
* statistički značajno uz $p < 0,05$



A



B



Slika 4.36 Maseni udio UPA (C_{UPA} , mg/100 mg_E) u NIE prije probave (–) i kumulativno otpuštenih UPA-a na kraju OP₃, GP₁₂₃ i IP₂₄₃ (broj u indeksu označava trajanje probave računajući od početka probave) faze *in vitro* simulirane probave iz NIE, te CS (A), CF (B) i M (C) inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) te indeks biodostupnosti (BI) UPA ispitivanih uzoraka (D). Različita velika i mala te slova grčke abecede označavaju skupine podataka koje se međusobno statistički značajno razlikuju prema faktorskom ANOVA testu i Duncanovom *post-hoc* testu uz $p < 0,05$

Otpuštanje UPA tijekom OP bilo je dosljedno niže kod svih inkapsuliranih uzoraka u usporedbi s svim NIE uzorcima, pri čemu su najviše vrijednosti zabilježene za NA_{SR} inkapsulate (0,12 – 0,53 mg/100 mg_E) (Slika 4.36 A–C). Ovo smanjenje otpuštanja u OP smatra se korisnim jer sprječava preuranjenu razgradnju proantocijanidina u ustima, gdje se njihova apsorpcija ne odvija (Ou i Gu, 2014; Niwano i sur., 2022). Tijekom GP, udio otpuštenih UPA bilo je niži kod svih NIE nego u OP dok je udio otpuštenih UPA iz svih inkapsulata bio nizak bez jasnog trenda otpuštanja (Slika 4.36 A–C). Ovo produljeno nisko otpuštanje koristi stabilnosti proantocijanidina, štiteći ih od razgradnje u kiselom želučanom okruženju i osiguravajući njihovo očuvanje za intestinalnu fazu, gdje se odvija većina apsorpcije. Međutim, u IP, otpuštanje UPA iz NIE dodatno se smanjilo. Kod inkapsulata nije primijećen jasan obrazac otpuštanja, osim minimalno povećanog otpuštanja UPA kod svih NA-ŽEL_{SR} inkapsulata u usporedbi s GP (Slika 4.36 A–C).

Prema faktorskom ANOVA testu (Tablica 4.39, Slika 4.38D) oba faktora „omotač“ (27,1 % varijance) i „ekstrakt“ (16,4 % varijance) imali su značajni utjecaj na BI UPA kod inkapsulacije sušenjem raspršivanjem uz izraženiju interakciju između faktora (55,2 % varijance). Omotači NA-ŽEL_{SR} i NA-GA_{SR} osigurali su veći BI u odnosu na NIE gdje su se BI vrijednosti kretale u rasponu 1,5 % – 4,0 %, dok su NA_{SR} inkapsulati imali manju srednju vrijednost BI od NIE. Općenito, najveća biodostupnost UPA zabilježena je kod inkapsulata koji su sadržavali M ekstrakt, a za inkapsulaciju je korišten omotač NA-ŽEL_{SR}.

Tablica 4.39 Faktorski ANOVA test za *BI* vrijednosti UPA - značajnost utjecaja (ne)omotača (NIE, NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) kod inkapsulacije sušenjem raspršivanjem te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Omotač	309,83	1	309,83	7752,35	0,0000 *	27,1 %
Ekstrakt	19,87	3	6,62	165,74	0,0000 *	16,4 %
Omotač × ekstrakt	12,03	2	6,02	150,56	0,0000 *	55,2 %
Pogreška	40,54	6	6,76	169,06		

* statistički značajno uz $p < 0,05$

4.6.5.2. Biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva

Rezultati otpuštanja pojedinačnih fenolnih spojeva (fenolne kiseline, stilbeni, flavanoli, flavonoli, antocijani) iz CS-NIE, CF-NIE i M-NIE te CS, CF i M inkapsulata, dobivenih sušenjem raspršivanjem tijekom tri faze simulirane probave *in vitro* prikazani su u **Tablicama P3.1. – 3.3.** U **Tablici 4.40** prikazane su *BI* vrijednosti samo za one ekstrakte i inkapsulate za koje je bilo moguće izračunati *BI* odnosno koji su detektirani nakon kompletne probave odnosno nakon IP faze probave (ukupno 15 spojeva: galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, epikatehin, epikatehin galat, galokatehin galat, procijanidini B1 i B2, rutin, oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid). Statistička analiza značajnosti utjecaja omotača i ekstrakta na biodostupnost pojedinačnih fenola prikazana u **Tablicama 4.40 i 4.41.**

Tablica 4.39 Biodostupnost (*BI*, %) pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranih ekstrakata (NIE) i različitih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem s obzirom na korišteni omotač (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) i ekstrakt tropa grožđa (CS, CF, M) te statistička značajnost utjecaja omotača i ekstrakta na *BI* fenolnih spojeva prema faktorskom ANOVA testu (Duncanov *post-hoc* test, $p < 0,05$)

Fenolni spoj	Uzorak		BI (%) [*]					
Fenolne kiseline								
Galna kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
	NIE	γ	22,4 ± 0,8	f	108,8 ± 4,9	bc	47,4 ± 0,3	d
	NA _{SR}	δ	42,8 ± 3,7	de	36,9 ± 0,4	def	26,9 ± 0,7	ef
	NA-GA _{SR}	β	117,0 ± 4,4	b	18,2 ± 0,0	f	222,6 ± 7,3	a
	NA-ŽEL _{SR}	α	215,5 ± 4,4	a	95,7 ± 0,4	c	218,5 ± 27,7	a
3,4-Dihidroksi-benzojeva kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
	NIE	δ	18,3 ± 0,6	h	70,6 ± 0,4	ef	12,3 ± 0,2	h
	NA _{SR}	γ	61,7 ± 2,9	g	67,1 ± 3,7	fg	66,9 ± 1,2	fg
	NA-GA _{SR}	β	77,0 ± 7,5	e	74,3 ± 2,8	ef	157,8 ± 2,7	c
	NA-ŽEL _{SR}	α	226,6 ± 3,8	b	149,0 ± 3,8	d	236,8 ± 5,7	a
Vanilinska kiselina	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
	NIE	δ	22,9 ± 1,1	g	29,6 ± 0,0	f	22,1 ± 0,7	g
	NA _{SR}	γ	53,0 ± 0,7	e	9,5 ± 0,8	h	49,3 ± 0,0	e
	NA-GA _{SR}	α	58,5 ± 2,0	d	22,6 ± 0,5	g	144,4 ± 4,1	a
	NA-ŽEL _{SR}	β	87,6 ± 2,8	b	24,0 ± 0,0	g	72,4 ± 4,6	c
Siringinska	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	
	NIE	δ	0,0	d	0,0	d	0,0	d

Fenolni spoj	Uzorak			BI (%)*				
kiselina	NA _{SR}	γ	0,0	d	2,7 ± 0,0	d	6,8 ± 0,2	c
	NA-GA _{SR}	α	0,0	d	1,6 ± 0,1	d	94,0 ± 1,5	a
	NA-ŽEL _{SR}	β	0,0	d	0,0	d	28,0 ± 5,5	b
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
Elaginska kiselina	NIE	δ	1,7 ± 0,1	ef	1,6 ± 0,0	ef	15,5 ± 0,5	e
	NA _{SR}	γ	9,0 ± 0,4	ef	0,0	f	70,2 ± 2,3	c
	NA-GA _{SR}	β	15,0 ± 1,8	e	7,9 ± 0,2	ef	90,6 ± 7,7	b
	NA-ŽEL _{SR}	α	38,1 ± 0,2	d	8,4 ± 0,4	ef	107,9 ± 18,5	a
	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^B		M ^A	
o-Kumarinska kiselina	NIE	δ	78,7 ± 12,4	d	48,1 ± 0,3	d	61,7 ± 0,6	d
	NA _{SR}	γ	191,0 ± 15,8	c	63,8 ± 3,0	d	57,8 ± 14,3	d
	NA-GA _{SR}	β	287,5 ± 37,2	b	19,5 ± 1,7	d	325,7 ± 6,6	b
	NA-ŽEL _{SR}	α	337,2 ± 31,5	b	54,8 ± 1,8	d	464,2 ± 66,8	a
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
p-Kumarinska kiselina	NIE	α	87,0 ± 3,3	b	272,8 ± 49,0	a	65,4 ± 2,5	b
	NA _{SR}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-GA _{SR}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-ŽEL _{SR}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
Epikatehin	NIE	γ	49,8 ± 1,1	d	0,0	f	15,6 ± 0,2	e
	NA _{SR}	γ	57,2 ± 1,2	d	3,6 ± 0,1	f	0,0	f
	NA-GA _{SR}	β	97,5 ± 13,0	b	4,9 ± 0,8	f	53,5 ± 0,7	d
	NA-ŽEL _{SR}	α	139,2 ± 1,8	a	8,8 ± 0,4	ef	83,6 ± 4,7	c
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
Epikatehin galat	NIE	δ	116,8 ± 13,2	d	98,8 ± 0,2	de	88,7 ± 8,8	de
	NA _{SR}	γ	113,6 ± 24,0	d	5,8 ± 0,3	f	367,8 ± 45,1	b
	NA-GA _{SR}	β	186,3 ± 28,5	c	36,7 ± 3,7	ef	461,0 ± 25,8	a
	NA-ŽEL _{SR}	α	356,4 ± 10,2	b	19,6 ± 1,6	f	476,4 ± 68,3	a
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
Galokatehin galat	NIE	δ	251,4 ± 10,4	h	150,0 ± 4,7	j	234,0 ± 0,2	h
	NA _{SR}	γ	692,4 ± 22,1	e	120,3 ± 0,5	k	580,7 ± 17,3	f
	NA-GA _{SR}	β	980,7 ± 17,9	d	197,6 ± 8,7	i	1342,7 ± 10,3	c
	NA-ŽEL _{SR}	α	2028,7 ± 15,0	a	348,2 ± 0,9	g	1970,9 ± 1,7	b
	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
Procijanidin B1	NIE	δ	0,0	f	0,0	f	0,0	f
	NA _{SR}	γ	71,2 ± 8,1	d	0,0	f	48,4 ± 4,5	e
	NA-GA _{SR}	β	130,4 ± 4,1	bc	0,0	f	119,1 ± 7,1	c
	NA-ŽEL _{SR}	α	155,1 ± 6,2	a	0,0	f	135,4 ± 14,9	b
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^C		M ^A	
Procijanidin B2	NIE	β	0,0	c	0,00	c	0,0	c
	NA _{SR}	β	0,0	c	11,1 ± 1,5	b	0,0	c
	NA-GA _{SR}	α	0,0	c	9,7 ± 0,1	b	283,8 ± 10,5	a
	NA-ŽEL _{SR}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	omotač / ekstrakt		CS ^A		CF ^C		M ^B	
Rutin	NIE	α	0,0	b	29,0 ± 2,8	a	0,0	b
	NA _{SR}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-GA _{SR}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	NA-ŽEL _{SR}	β	0,0	b	0,0	b	0,0	b
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^A		M ^B	
Antocijani	NIE	α	34,4 ± 2,8	cd	32,7 ± 2,9	cd	62,6 ± 4,5	a
	NA _{SR}	γ	9,1 ± 1,4	ef	4,7 ± 0,1	f	14,9 ± 0,2	e
	NA-GA _{SR}	β	28,0 ± 3,6	d	3,4 ± 0,3	f	40,1 ± 0,0	bc
	NA-ŽEL _{SR}	α	63,9 ± 10,5	a	10,2 ± 0,7	ef	44,7 ± 4,6	b
	omotač / ekstrakt		CS ^B		CF ^B		M ^A	

Fenolni spoj	Uzorak	<i>BI (%)</i> *						
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid	NIE	α	24,7 ± 4,3	b	24,0 ± 2,9	b	42,4 ± 5,9	a
	NA _{SR}	β	0,0	c	2,5 ± 0,3	c	0,0	c
	NA-GA _{SR}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c
	NA-ŽEL _{SR}	β	0,0	c	0,0	c	0,0	c

* srednje vrijednosti ± SD pojedinih grupa podataka; različita slova (velika, mala te mala slova grčke abecede) označavaju statistički značajno različite skupove podataka za svaki faktor

Tablica 4.41 Statistička značajnost utjecaja omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) i ekstrakta tropa grožđa (CS, CF i M) na *BI* pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranih ekstrakata i njihovih inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem prema faktorskom ANOVA testu te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Fenolni spoj	Faktor	<i>p</i>	Veličina efekta
Galna kiselina	omotač	0,0000 *	50,5 %
	ekstrakt	0,0000 *	11,5 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	37,3 %
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	omotač	0,0000 *	81,4 %
	ekstrakt	0,0000 *	2,9 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	15,5 %
Vanilinska kiselina	omotač	0,0000 *	29,3 %
	ekstrakt	0,0000 *	33,4 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	37,1 %
Fenolne kiseline	omotač	0,0000 *	22,6 %
	ekstrakt	0,0000 *	32,6 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	44,6 %
Siriginska kiselina	omotač	0,0000 *	20,6 %
	ekstrakt	0,0000 *	63,5 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	14,6 %
Elaginska kiselina	omotač	0,0000 *	36,7 %
	ekstrakt	0,0000 *	34,0 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	27,8 %
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	omotač	0,0000 *	62,4 %
	ekstrakt	0,0000 *	9,0 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	26,9 %
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	omotač	0,0000 *	29,0 %
	ekstrakt	0,0000 *	58,6 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	12,0 %
Epikatehin	omotač	0,0000 *	16,9 %
	ekstrakt	0,0000 *	56,7 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	25,1 %
Epikatehin galat	omotač	0,0000 *	49,1 %
	ekstrakt	0,0000 *	32,8 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	18,1 %
Flavanoli	omotač	0,0000 *	38,7 %
	ekstrakt	0,0000 *	41,1 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	19,7 %
Procijanidin B1	omotač	0,0000 *	28,8 %
	ekstrakt	0,0000 *	17,1 %
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	54,0 %
Procijanidin B2	omotač	0,0000 *	27,1 %
	ekstrakt	0,0000 *	
	omotač × ekstrakt	0,0000 *	
Flavonoli	Rutin	omotač	0,0000 *

		ekstrakt	0,0000 *	18,1 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	54,3 %
Antocijani	Oenin klorid	omotač	0,0000 *	42,7 %
		ekstrakt	0,0000 *	33,5 %
		omotač × ekstrakt	0,0000 *	22,0 %
	Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	omotač	0,0000 *	88,9 %
		ekstrakt	0,0037 *	2,1 %
		omotač × ekstrakt	0,0002 *	7,6 %

* statistički značajan utjecaj uz $p < 0,05$

Faktorijalni ANOVA test pokazuje da su oba faktora (omotač i ekstrakt) imali statistički značajan utjecaj na *BI* vrijednosti pojedinačnih fenolnih spojeva kod inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem te da postoji statistički značajna interakcija između faktora (**Tablica 4.41**). Utjecaj faktora „omotač“ bio je dominantan na varijabilnost *BI* kod 9 pojedinačnih fenolnih spojeva (galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, galokatehin galat, procijanidini B2, rutin, oenin klorid i peonidin-3-*O*-glukozid klorid) s 27,1 – 88,9 % varijance, dok je utjecaj faktora „ekstrakt“ imao najveći utjecaj na varijabilnost *BI* kod 6 fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, epikatehin, epikatehin galat, procijanidini B1) s 32,6 – 63,5 % varijance.

Kod većine fenolnih spojeva uočeno je da je inkapsulacija sušenjem raspršivanjem pridonijela povećanju njihove biodostupnosti u odnosu na NIE (**Tablica 4.40**). Međutim, rezultati *post-hoc* analize (Duncanov test, $p < 0,05$) pokazuju da se ne izdvaja niti jedan omotač i ekstrakt koji su imali najveći utjecaj na *BI* vrijednosti svih navedenih pojedinačnih fenolnih spojeva što je u skladu s visokim doprinosom utjecaja interakcije omotača i ekstrakta na varijabilnosti *BI* vrijednosti svih pojedinačnih spojeva (7,6 – 54,3 % varijance) (**Tablice 4.40 i 4.41**). Općenito, u pogledu ispitivanih omotača može se uočiti da je NA-ŽEL_{SR} imala najveći utjecaj na povećanje biodostupnosti kod 8 fenolnih spojeva (galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, epikatehin, epikatehin galat, galokatehin galat, procijanidini B1), potom NA-GA_{SR} na 3 fenolna spoja (vanilinska kiselina, siringinska kiselina, procijanidini B2) dok je NA_{SR} od omotača najmanje pridonosio porastu *BI* fenolnih spojeva te su u nekim slučajevima *BI* vrijednosti fenolnih spojeva iz ovih inkapsulata bile ili niže od NIE (npr. *BI* za galnu kiselinu) ili nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na NIE (npr. *BI* za epikatehin). Može se pretpostaviti da dodatak drugog omotača natrij alginatu pridonosi jačim interakcijama između omotača i fenolnih spojeva kao što su zaključili drugi autori (Ribas-Agustí i sur., 2018; Sęczyk i sur., 2021). Na primjer, hidroksilne skupine galne kiseline mogu formirati stabilizirajuće vodikove veze sa želatinom u NA-ŽEL_{SR} inkapsulatima

(Hager i sur., 2012; Asghari-Varzaneh i sur., 2024), dok svojstva stabiliziranja emulzije gume arabike u NA-GA_{SR} inkapsulatima stvaraju zaštitno okruženje za primjerice siringinsku kiselinu (Patel i Goyal, 2015; De Souza i sur., 2019). Ove interakcije između fenolnih spojeva i matriksa inkapsulata utječu na učinkovitost zaštite pojedinačnih fenolnih kiselina, njihovo otpuštanje i konačno poboljšanje biodostupnosti. Rezultati upućuju da kombinacija omotača pomaže u zaštiti aktivnih sastojaka od rane razgradnje, omogućujući njihovo ciljano oslobađanje u intestinalnoj fazi, gdje je apsorpcija najpovoljnija. U pogledu ekstrakata, sveukupno, najveće vrijednosti *BI* za većinu fenolnih spojeva uočene su kod M ekstrakta ili inkapsulata dok su najniže vrijednost *BI* većinom zabilježene kod CF ekstrakta ili inkapsulata (**Tablica 4.40**).

Fenolne kiseline kvantificirane nakon IP faze su galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, *o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina. Najviše vrijednosti *BI* galne kiseline zabilježene su kod M te CS inkapsulata pripremljenih s omotačem NA-ŽEL_{SR} (215,5 – 218,5 %) te M-NA-GA_{SR} inkapsulata (222,6 %). Ove vrijednosti su bile značajno veće, i to 4,6 – 9,6 puta, u odnosu na CS-NIE i M-NIE dok NA_{SZ} inkapsulati pripremljeni s ovim ekstraktima nisu doprinijeli povećanju *BI* galne kiseline. Isto tako, kod CF uzorka inkapsulacija nije doprinijela povećanju *BI* galne kiseline. Kod 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline, *BI* vrijednosti su bile veće za 2,1 – 19,3 puta za sve NA-ŽEL_{SR} inkapsulate u odnosu na NIE, a najviša *BI* vrijednost ove kiseline je utvrđena kod M-NA-ŽEL_{SR} (236,8%). *BI* za sve NA-GA_{SR} inkapsulate bila je veća do 12,8 puta u odnosu na NIE, dok je kod CS-NA_{SR} i M-NA_{SR} vrijednost bila veća 3,5 puta odnosno 5,4 puta u odnosu na pripadajuće NIE, a CF-NA_{SR} inkapsulati nisu pridonijeli povećanju biodostupnosti u odnosu na CF-NIE. Biodostupnost vanilinske kiseline poboljšana je inkapsulacijom sušenjem raspršivanjem (izuzev kod uzoraka CF) i to za 2,2 – 6,5 puta u odnosu na NIE, a najveća biodostupnost je utvrđena kod M-NA-GA_{SR} inkapsulata (144,4 %). Siringinska kiselina pokazala je specifičan obrazac otpuštanja, pri čemu se uglavnom oslobađala tijekom OP i GP, te kod svih CS uzorka te CF-NIE i M-NIE nije detektirana u IP što je rezultiralo nemogućnošću izračunavanja njezinog *BI*. Međutim, u IP, siringinska kiselina detektirana je kod CF i M inkapsulata koji su doprinijeli povećanju *BI* u odnosu na NIE, a najveća vrijednost *BI* postignuta je kod M-NA-GA_{SR} inkapsulata (94,0 %). Kod elaginske kiseline, koja je iz NIE minimalno otpuštena samo u IP, *BI* vrijednosti su bile veće (5,3 – 22,4 puta kod NA-ŽEL_{SR} inkapsulata; 4,5 – 8,8 puta kod NA-GA_{SR} inkapsulata te 4,5 – 5,3 puta kod NA_{SR} inkapsulata, te) u odnosu na NIE, a najviša *BI* vrijednost (107,9 %) je utvrđena kod M-NA-ŽEL_{SR}. *BI* vrijednosti *o*-kumarinske kiseline iz većine inkapsulata (izuzev CF-NA-

G_{ASR} i $M-NA_{SR}$) u odnosu na NIE bile su veće za 1,1 – 7,5 puta, a najveći BI od 464,2 % je ostvaren kod $M-NA-ŽEL_{SR}$. S druge strane, p -kumarinska kiselina, koja je detektirana u svim fazama probave NIE, nije bila prisutna tijekom simulirane probave inkapsulata, što ukazuje na moguća ograničenja u učinkovitosti inkapsulacije ovog spoja ili na niske početne koncentracije spoja. Ostale fenolne kiseline, p -hidroksibenzojeva kiselina, kafeinska kiselina i ferulinska kiselina koje su detektirane u neinkapsuliranim CS, CF i M ekstraktima prije probave nisu detektirane u niti jednoj fazi simulirane probave NIE uzoraka i pripadajućih inkapsulata (Tablice 4.3 i 4.40, Tablica P3.1 – 3.3).

Flavanoli. Profil otpuštanja svih flavanola prikazan je u Tablicama P3.1 – 3.3, gdje je vidljivo da neki od flavanola nisu detektirani u svim fazama probave, a za one koji nisu detektirani u IP fazi (katehin iz svih ekstrakata i inkapsulata, epikatehin iz CF ekstrakta i $M-NA_{SR}$ inkapsulata, procijanidin B1 iz CS-NIE, CF-NIE i M-NIE te iz svih CF inkapsulata, procijanidin B2 iz svih NIE i svih CS inkapsulata, te CF- $NA-ŽEL_{SR}$ inkapsulata, $M-NA_{SR}$ i $M-NA-ŽEL_{SR}$) nije bilo moguće izračunati BI . Sveukupno iz svih rezultata je vidljivo da su BI vrijednosti za epikatehin i procijanidin B1 bile su najveće kod CS ekstrakta, dok su za ostale flavanole BI vrijednosti bile najveće kod uzorka M, a najniže kod uzorka CF. Nadalje, biodostupnost svih flavanola je poboljšana inkapsulacijom raspršivanjem pomoću jednog ili više omotača pri čemu je dodatni omotač dodan alginatu pozitivno utjecao na BI flavanola.

Otpuštanje epikatehina variralo je ovisno o ekstraktu i korištenim omotačima. Biodostupnost ovog spoja bila je već za 1,1 – 5,4 puta veća iz inkapsulata nego iz NIE, a najveći BI određen je za CS- $NA-ŽEL_{SR}$ inkapsulate (139,2 %). Epikatehin galat, koji nije bio prisutan u OP, imao je BI vrijednosti veće za 1,6 – 5,4 puta kod CS i M inkapsulata u odnosu na NIE, a najveći BI je uočen kod $M-NA-ŽEL_{SR}$ (476,4 %) dok BI CF uzoraka nije bilo moguće odrediti. U skupini flavanola galokatehin galat imao je najveće BI vrijednosti koje su bile od 1,3 do 8,4 puta veće kod inkapsulata u odnosu na NIE, a najveći BI je određen kod CS- $NA-ŽEL_{SR}$ inkapsulata (2028,7%). Procijanidin B1, koji je minimalno otpušten iz NIE u OP i GP, pokazao je poboljšanje BI nakon inkapsulacije kod uzorka CS i M s najvećim BI za inkapsulate CS- $NA-ŽEL_{SR}$ (155,1 %) dok BI kod CF uzorka nije bilo moguće kao niti kod svih NIE uzoraka. Procijanidin B2, iako je pokazao ograničeno otpuštanje u većini uzoraka, dosegao je najveći BI za $M-NA-GA_{SR}$ inkapsulate s vrijednošću od 283,8 %. Niža stabilnost procijanidina B2 u kasnijim fazama probave može se pripisati njegovom kompleksiranju s drugim sastojcima prehrane ili njegovoj brzom razgradnji tijekom probavnog procesa, kako su opisali (Zhu i sur., 2002; Ou i Gu, 2014) (Tablice 4.3 i 4.40, Tablice P3.1 – 3.3).

Stilbeni i flavonoli. Tijekom probave nije zabilježeno otpuštanje stilbena resveratrola i ϵ -viniferina u niti jednom od neinkapsuliranih i inkapsuliranih uzoraka što ukazuje na njihovu visoku osjetljivost na probavne uvjete. Ovi rezultati su u skladu s literaturom koja ističe osjetljivost ovih spojeva na pH i enzime probavnog sustava (Giuliani i sur., 2016). Slično tome, otpuštanje flavonola kempferola nije zabilježeno niti iz NIE niti iz inkapsulata tijekom probave. Međutim, dva druga ispitivana flavonola, kvercetin i rutin, detektirana su u OP i GP fazi za sve NIE (rutin i u IP kod NIE-CF), dok nisu identificirani u inkapsuliranim uzorcima (**Tablice 4.3 i 4.40, Tablica P3.1 – 3.3**).

Antocijani. Statistička analiza (ANOVA, Ducanov *post-hoc* test, $p < 0,05$) je pokazala da nema statistički značajne razlike u biodostupnosti oenin klorida iz NA-ŽEL_{SR} inkapsulata i NIE te da ostali inkapsulati nisu pridonijeli povećanju biodostupnosti ovog spoja u odnosu na NIE. S druge strane, mirtilin klorid i petunidin klorid detektirani su isključivo u NIE prije probave te tijekom OP i GP oralne, dok u IP ovi antocijani nisu bili prisutni (**Tablice 4.3, Tablice P3.1 – 3.3**). Kuromanin klorid tijekom probave nije dokazan niti u NIE niti u inkapsulatima. Kalistefin klorid dokazan je jedino kod CF-NIE prije probave dok tijekom probave nije dokazan niti u jednoj fazi probave (**Tablice 4.3, Tablice P3.1 – 3.3**). Kod peonidin-3-*O*-glukozid klorida, *BI* vrijednosti su određene za sve NIE, krećući se u rasponu od 24,0 % do 42,4 % (**Tablice 4.3 i 4.40, Tablice P3.1 – 3.3**). Međutim, inkapsulacija nije poboljšala *BI* ovog spoja, što ukazuje na njegovu nisku stabilnost pod ispitivanim uvjetima. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja ističu osjetljivost antocijanina na probavne uvjete (Tarone i sur., 2020).

Zaključno, prema rezultatima u poglavlju 4.6, statistička analiza pokazala je da su i omotač i ekstrakt statistički značajno utjecali na EE_{SR} uz značajnu interakciju između faktora. Najveći utjecaj na varijabilnost EE_{SR} imao je omotač. Najviše vrijednosti EE_{SR} postignute su kod kombinacije omotača NA-ŽEL_{SR} (95,90 – 98,01 %), a bile su veće za 1,4 – 1,7 puta u odnosu EE_{SR} za NA_{SR} inkapsulate. Što se tiče ekstrakta, M ekstrakti su imali niže prosječne vrijednost EE_{SR} u odnosu na CS i CF ekstrakte.

Nadalje, analiza veličine inkapsulata pokazala je jasnu povezanost između vrste omotača i homogene raspodjele čestica. Kombinacijom omotača NA-GA_{SR} i NA-ŽEL_{SR} dobiveni su manji i ujednačeniji inkapsulati, dok je primjena samog NA_{SR} rezultirala većim česticama s širokom distribucijom veličine čestica. Ove informacije o veličini i raspodjeli čestica imaju ključnu ulogu pri odabiru omotača, jer direktno utječu na potencijalnu primjenu inkapsulata, uključujući zaštitu aktivnih tvari i kontrolirano ili produženo otpuštanje.

Termofizikalna analiza pokazala je da su $NA-GA_{SR}$ i $NA-\check{Z}EL_{SR}$ inkapsulati imali homogeniju strukturu i blago povećanu toplinsku stabilnost u odnosu na NA_{SR} . Intenziteti vrhova i širi prijelazi u termogramima ovih inkapsulata ukazuju na sporiju degradaciju i jače interakcije omotača s fenolnim spojevima, dok termogram za NA_{SR} pokazuje oštrije prijelaze i veću toplinsku osjetljivost. Ovi rezultati ukazuju da kombinacija polimera u omotaču može poboljšati stabilnost i očuvanje funkcionalnih svojstava fenolnih spojeva tijekom procesa sušenja i skladištenja.

Provedbom otpuštanja UF-a zaključeno je da su se iz NA_{SR} inkapsulata UF oslobađali brzo u OP fazi, dok je u GP i IP otpuštanje bilo umjereno. Dodatkom GA natrijevom alginatu očuvanje UF-a u ranim fazama se poboljšalo, iako je dodatkom $\check{Z}EL$ natrijevom alginatu bio vidljiv najpovoljniji profil otpuštanja s minimalnim otpuštanjem u OP i GP te povećanje udjela otpuštenih UF u IP fazi, što omogućuje ciljano oslobađanje u crijevima. Kinetiku otpuštanja UF-a iz NA_{SR} i $NA-GA_{SR}$ inkapsulata najbolje opisuje model prvog reda uz Fickovu difuziju kao glavni mehanizam otpuštanja UF-a, dok otpuštanje iz $NA-\check{Z}EL_{SR}$ najbolje aproksimira Higuchijev model.

Sveukupno, svi $NA-\check{Z}EL_{SR}$ inkapsulati dosljedno su pokazali najviše BI vrijednosti za UF, UFL i UPA za sve ekstrakte, što ukazuje na njihovu iznimnu zaštitu u ranijim fazama probave i učinkovitost otpuštanja u crijevnoj fazi. Inkapsulati CS i M pokazali su dosljednost u profilu otpuštanja kroz faze probave i povezanost biodostupnosti, dok su inkapsulati CF pokazali određena odstupanja. Ipak, čak i za CF- $NA-\check{Z}EL_{SR}$ inkapsulate, značajno je poboljšana biodostupnost u usporedbi s NIE, potvrđujući prednost ove kombinacije omotača pred ostalim omotačima. $NA-\check{Z}EL_{SR}$ inkapsulati imali su veći BI za UF, UFL i UPA u odnosu na NIE za 1,1 – 5,8 puta.

Omotač i ekstrakt statistički su značajno utjecali na biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva kod inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem, pri čemu je omotač imao dominantnu ulogu za većinu spojeva. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem je općenito povećala BI u odnosu na NIE, što potvrđuje da primjena omotača značajno poboljšava zaštitu i potencijalnu apsorpciju fenolnih spojeva tijekom probave. Kombinacija $NA-\check{Z}EL_{SR}$ pokazala se najučinkovitijom u očuvanju većine spojeva tijekom ranih faza probave, omogućujući kontrolirano otpuštanje u intestinalnoj fazi, dok je sam NA_{SR} imao najmanji učinak. NA_{SR} inkapsulati rezultirali s BI vrijednostima većim za 1,1 – 5,4 puta u odnosu na NIE, $NA-GA_{SR}$ inkapsulati za 1,3 – 12,8 puta te $NA-\check{Z}EL$ inkapsulati za 1,1 – 22,4 puta većim BI vrijednostima u odnosu na NIE. Interakcija omotača i ekstrakta imala je značajan utjecaj na varijabilnost BI ,

što naglašava važnost odabira optimalnih kombinacija omotača i ekstrakta za postizanje najboljeg *BI*. U pogledu ekstrakata, najveće vrijednosti *BI* za većinu fenolnih spojeva zabilježene su kod M ekstrakta, dok su najniže vrijednosti uglavnom povezane s CF ekstraktom, što pokazuje da i priroda ekstrakta utječe na otpuštanje i potencijalnu apsorpciju bioaktivnih spojeva.

4.7. USPOREDBA INDEKSA BIODOSTUPNOSTI FENOLNIH SPOJEVA - UTJECAJ METODE, OMOTAČA I EKSTRAKT

Usporedba srednjih *BI* vrijednosti za UF, UFL i UPA ostvarenih iz CS, CF i M inkapsulata dobivenih različitim metodama inkapsulacije (ionskim geliranjem - IG, sušenjem zamrzavanjem - SZ i sušenjem raspršivanjem - SR) uz pomoć različitih omotača (NA, NA-GA, NA-ŽEL) prikazana je u **Tablici 4.42**. Statistička značajnost utjecaja metode inkapsulacije, omotača i ekstrakta na zavisne varijable odnosno *BI* procijenjena je faktorskim ANOVA testom (**Tablica 4.43**) i Duncanovim *post-hoc* testom ($p < 0,05$) (**Tablica 4.42**).

Tablica 4.42 Usporedba biodostupnosti (*BI*, %) pojedinih skupina fenolnih spojeva (UF, UFL, UPA) iz različitih inkapsulata s obzirom na metodu inkapsulacije (IG, SZ, SR), korišteni omotač (NA, NA-GA, NA-ŽEL) i ekstrakata tropa grožđa (CS, CF, M), prema faktorskom ANOVA testu

Faktor		Zavisna varijabla: <i>BI</i> (%) [*]		
		UF	UFL	UPA
Metoda inkapsulacije	IG	76,6 ± 26,2 ^x	9,4 ± 3,4 ^y	4,1 ± 2,0 ^x
	SZ	59,4 ± 29,4 ^y	9,8 ± 2,9 ^x	3,0 ± 1,6 ^z
	SR	58,7 ± 32,8 ^y	7,0 ± 3,4 ^z	3,6 ± 1,5 ^y
Omotač	NA	39,5 ± 12,9 ^γ	5,8 ± 1,8 ^γ	2,9 ± 1,4 ^γ
	NA-GA	62,0 ± 20,8 ^β	9,3 ± 3,2 ^β	3,3 ± 1,4 ^β
	NA-ŽEL	93,2 ± 27,1 ^α	11,1 ± 2,6 ^α	4,5 ± 2,0 ^α
Ekstrakt	CS	72,5 ± 27,1 ^A	9,2 ± 2,5 ^A	3,7 ± 1,9 ^A
	CF	58,0 ± 34,8 ^C	9,1 ± 4,4 ^A	3,6 ± 1,9 ^{AB}
	M	64,1 ± 28,1 ^B	7,9 ± 3,1 ^B	3,4 ± 1,4 ^B

^{*} srednje vrijednosti ± SD pojedinih grupa podataka; različita slova označavaju statistički značajno različite skupove podataka za svaki faktor

Tablica 4.43 Faktorski ANOVA test za *BI* za UF, UFL i UPA iz različitih inkapsulata – značajnost utjecaja metode inkapsulacije, omotača i ekstrakta tropa grožđa te veličina efekta (doprinos faktora i njihove interakcije varijanci pojedinog skupa podataka)

Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> _{UF}						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	5529,5	2	2764,7	902,8	0,0000 [*]	7,5 %

Omotač	39186,6	2	19593,3	6398,2	0,0000 *	53,0 %
Ekstrakt	2832,1	2	1416,1	462,4	0,0000 *	3,8 %
Metoda × omotač	1027,9	4	257,0	83,9	0,0000 *	1,4 %
Metoda × ekstrakt	19171,8	4	4793,0	1565,1	0,0000 *	25,9 %
Omotač × ekstrakt	260,2	4	65,0	21,2	0,0000 *	0,4 %
Metoda × omotač × ekstrakt	5750,6	8	718,8	234,7	0,0000 *	7,8 %
Pogreška	165,4	54	3,1			

Faktorski ANOVA test za BI_{UFL}

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	123,1	2	61,6	402,3	0,0000 *	13,2 %
Omotač	399,1	2	199,6	1304,1	0,0000 *	42,6 %
Ekstrakt	28,3	2	14,2	92,6	0,0000 *	3,0 %
Metoda × omotač	19,8	4	4,9	32,3	0,0000 *	2,1 %
Metoda × ekstrakt	267,5	4	66,9	437,0	0,0000 *	28,6 %
Omotač × ekstrakt	1,1	4	0,3	1,8	0,1426 ^{ns}	
Metoda × omotač × ekstrakt	88,8	8	11,1	72,6	0,0000 *	9,5 %
Pogreška	8,3	54	0,2			

Faktorski ANOVA test za BI_{UPA}

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	13,9	2,0	6,9	37,5	0,0000 *	5,6 %
Omotač	40,4	2,0	20,2	109,1	0,0000 *	16,4 %
Ekstrakt	1,2	2,0	0,6	3,2	0,0494 *	0,5 %
Metoda × omotač	15,0	4,0	3,8	20,2	0,0000 *	6,1 %
Metoda × ekstrakt	116,2	4,0	29,1	156,8	0,0000 *	47,2 %
Omotač × ekstrakt	5,7	4,0	1,4	7,6	0,0001 *	2,3 %
Metoda × omotač × ekstrakt	43,8	8,0	5,5	29,5	0,0000 *	17,8 %
Pogreška	10,0	54,0	0,2			

* statistički značajno ($p < 0,05$); ^{ns} nije statistički značajno ($p > 0,05$)

Prema faktorskom ANOVA testu (**Tablica 4.43**) sva tri faktora (metoda inkapsulacije, omotač, ekstrakt) kao i njihove interakcije (izuzev interakcije omotača i ekstrakta kod UFL-a) su imala statistički značajan utjecaj na biodostupnost UF-a, UFL-a i UPA. Pri tome je omotač imao najveći utjecaj na varijabilnost svih podataka (53 % varijance kod UF-a, 42,6 % UFL-a i 16,4 % kod UPA), potom metoda inkapsulacije (7,5 % kod UF-a, 13,2% kod UFL-a i 5,6 % kod UPA) te ekstrakt (3,8 % kod UF-a, 3,0 % kod UFL-a i 0,5% kod UPA). Od svih interakcija, utjecaj interakcije metode i ekstrakta na BI sve tri zavisne varijable je najviše bio izražen sa 25,9 – 47,2 % varijance. Iz **Tablice 4.42** vidljivo je da je najveća biodostupnost za UF-a i UPA ostvarena iz inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem dok je za UFL najveća biodostupnost ostvarena kod inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem. Biodostupnost UF-a, UFL-a i UPA bila je najveća kada je korišten omotač NA-ŽEL, te kod CS uzorka iako se BI za UFL i UPA kod CF ekstrakta nije statistički značajno razlikovala od CS uzorka.

Usporedba srednjih BI vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve ostvarenih iz CS, CF i M inkapsulata dobivenih različitim metodama inkapsulacije (IG, SZ i SR) uz pomoć različitih omotača (NA, NA-GA, NA-ŽEL) prikazana je u **Tablici 4.42**. Statistička značajnost utjecaja

metode inkapsulacije, omotača i ekstrakta na zavisne varijable odnosno *BI* procijenjena je faktorskim ANOVA testom (**Tablica 4.45**) i Duncanovim post hoc testom ($p < 0,05$) (**Tablica 4.44**).

ZA OCJENU

Tablica 4.44 Usporedba biodostupnosti (*BI*, %) pojedinačnih fenolnih spojeva iz različitih inkapsulata s obzirom na metodu inkapsulacije (IG, SZ, SR), korišteni omotač (NA, NA-GA, NA-ŽEL) i ekstrakt tropa grožđa (CS, CF, M), prema faktorskom ANOVA testu

Faktor	Metoda inkapsulacije			Omotač			Ekstrakt		
	IG	SZ	SR	NA	NA-GA	NA-ŽEL	CS	CF	M
<i>Polifernolni spoj</i>	<i>Zavisna varijabla: BI (%)</i>								
Galna kiselina	151,3 ± 99,9 ^x	33,6 ± 28,5 ^z	110,4 ± 85,0 ^y	52,8 ± 49,3 ^γ	88,1 ± 64,6 ^β	154,3 ± 115,5 ^α	112,5 ± 97,8 ^A	81,5 ± 99,5 ^C	101,2 ± 74,9 ^B
3,4-Dihidroksi-benzojeva kiselina	167,8 ± 206,1 ^x	43,0 ± 33,9 ^z	124,1 ± 68,7 ^y	63,2 ± 64,9 ^γ	85,1 ± 47,3 ^β	186,7 ± 203,0 ^α	77,9 ± 65,5 ^B	176,4 ± 202,0 ^A	80,6 ± 71,4 ^B
Vanilinska kiselina	41,2 ± 31,9 ^z	46,4 ± 13,6 ^y	57,9 ± 39,7 ^x	35,3 ± 13,6 ^γ	60,5 ± 35,2 ^α	49,7 ± 34,3 ^β	64,4 ± 19,0 ^A	24,1 ± 13,3 ^C	57,0 ± 37,7 ^B
Siringinska kiselina	0,0 ± 0,0 ^z	8,7 ± 25,4 ^y	14,8 ± 30,2 ^x	1,1 ± 2,3 ^γ	19,3 ± 37,0 ^α	3,1 ± 9,2 ^β	0,0 ± 0,0 ^C	9,2 ± 25,2 ^B	14,3 ± 30,4 ^A
Elaginska kiselina	16,6 ± 13,8 ^z	26,3 ± 21,7 ^y	38,6 ± 39,8 ^x	21,2 ± 22,1 ^β	22,2 ± 26,8 ^β	38,1 ± 33,3 ^α	14,9 ± 10,5 ^B	12,5 ± 9,7 ^B	54,0 ± 33,9 ^A
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	973,1 ± 539,0 ^x	228,6 ± 103,2 ^y	200,2 ± 156,5 ^y	330,5 ± 329,4 ^γ	416,8 ± 341,6 ^β	654,5 ± 669,0 ^α	485,3 ± 394,6 ^B	273,5 ± 315,2 ^C	643,2 ± 635,9 ^A
Katehin	9,2 ± 19,6 ^x	2,3 ± 6,8 ^y	0,0 ± 0,0 ^z	0,0 ± 0,0 ^γ	2,8 ± 8,1 ^β	8,8 ± 19,2 ^α	0,0 ± 0,0 ^B	0,0 ± 0,0 ^B	11,6 ± 19,6 ^A
Epikatehin	376,3 ± 231,8 ^x	97,5 ± 90,3 ^y	49,8 ± 48,4 ^z	139,2 ± 140,3 ^γ	174,7 ± 210,8 ^β	209,6 ± 251,7 ^α	297,0 ± 260,3 ^A	58,2 ± 72,1 ^C	168,3 ± 163,9 ^B
Epikatehin galat	1017,9 ± 776,0 ^x	458,9 ± 288,3 ^y	224,9 ± 188,1 ^z	371,1 ± 274,1 ^γ	504,1 ± 452,5 ^β	826,4 ± 822,3 ^α	728,6 ± 496,0 ^B	154,4 ± 149,5 ^C	818,6 ± 727,3 ^A
Galokatehin galat	870,2 ± 392,9 ^x	577,8 ± 261,0 ^y	918,0 ± 700,6 ^z	475,8 ± 199,4 ^γ	729,8 ± 377,3 ^β	1160,5 ± 591,1 ^α	1032,0 ± 491,6 ^A	370,2 ± 173,1 ^C	963,8 ± 482,7 ^B
Procijanidin B1	2,7 ± 7,9 ^y	0,0 ± 0,0 ^z	73,3 ± 62,2 ^x	13,3 ± 26,3 ^β	30,4 ± 52,5 ^α	32,3 ± 62,4 ^α	39,6 ± 61,4 ^A	0,0 ± 0,0 ^C	36,4 ± 52,8 ^B
Procijanidin B2	15,9 ± 31,2 ^y	3,1 ± 9,0 ^z	33,8 ± 91,1 ^x	1,2 ± 3,6 ^γ	42,2 ± 90,0 ^α	9,4 ± 27,2 ^β	0,0 ± 0,0 ^C	5,4 ± 9,3 ^B	47,4 ± 91,3 ^A
Oenin klorid	0,6 ± 1,7 ^z	12,2 ± 8,5 ^y	24,3 ± 20,8 ^x	8,5 ± 8,7 ^γ	10,4 ± 13,8 ^β	18,2 ± 22,0 ^α	13,8 ± 20,5 ^B	5,6 ± 4,1 ^C	17,8 ± 16,8 ^A
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid	0,0 ± 0,0 ^z	3,5 ± 7,5 ^x	0,3 ± 0,8 ^y	3,8 ± 7,4 ^α	0,0 ± 0,0 ^β	0,0 ± 0,0 ^β	0,0 ± 0,0 ^C	1,3 ± 3,0 ^B	2,5 ± 7,3 ^A

* srednje vrijednosti ± SD pojedinih grupa podataka; različita slova označavaju statistički značajno različite skupove podataka za svaki faktor

Tablica 4.45 Faktorski ANOVA test za *BI* za pojedinačne fenolne spojeve iz različitih inkapsulata – značajnost utjecaja: metode inkapsulacije, omotača i ekstrakta tropa grožđa

Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (galna kiselina)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	128552,0	2	64276,0	975,7	0,0000 *	29,6 %
Omotač	95575,5	2	47787,8	725,4	0,0000 *	22,0 %
Ekstrakt	8867,1	2	4433,6	67,3	0,0000 *	2,0 %
Metoda × omotač	51049,4	4	12762,4	193,7	0,0000 *	11,7 %
Metoda × ekstrakt	56804,6	4	14201,2	215,6	0,0000 *	13,1 %
Omotač × ekstrakt	28972,8	4	7243,2	110,0	0,0000 *	6,7 %
Metoda × omotač × ekstrakt	63265,3	8	7908,2	120,0	0,0000 *	14,5 %
Pogreška	1778,7	27	65,9			
Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (3,4-dihidroksi-benzojeva kiselina)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	144490,1	2	72245,0	488,9	0,0000 *	15,0 %
Omotač	156408,0	2	78204,0	529,2	0,0000 *	16,2 %
Ekstrakt	113400,9	2	56700,4	383,7	0,0000 *	11,7 %
Metoda × omotač	87702,0	4	21925,5	148,4	0,0000 *	9,1 %
Metoda × ekstrakt	231188,7	4	57797,2	391,1	0,0000 *	23,9 %
Omotač × ekstrakt	45463,0	4	11365,7	76,9	0,0000 *	4,7 %
Metoda × omotač × ekstrakt	183772,8	8	22971,6	155,5	0,0000 *	19,0 %
Pogreška	3989,7	27	147,8			
Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (vanilinska kiselina)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	2631,8	2	1315,9	95,9	0,0000 *	5,3 %
Omotač	5765,4	2	2882,7	210,0	0,0000 *	11,5 %
Ekstrakt	16615,2	2	8307,6	605,2	0,0494 *	33,3 %
Metoda × omotač	2852,3	4	713,1	51,9	0,0000 *	5,7 %
Metoda × ekstrakt	8585,4	4	2146,3	156,4	0,0000 *	17,2 %
Omotač × ekstrakt	7478,6	4	1869,6	136,2	0,0001 *	15,0 %
Metoda × omotač × ekstrakt	5629,8	8	703,7	51,3	0,0000 *	11,3 %
Pogreška	370,6	27	13,7			
Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (siringinska kiselina)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	1988,7	2	994,4	257,1	0,0000 *	7,0 %
Omotač	3602,9	2	1801,4	465,8	0,0000 *	12,7 %
Ekstrakt	1893,0	2	946,5	244,7	0,0000 *	6,7 %
Metoda × omotač	1859,1	4	464,8	120,2	0,0000 *	6,5 %
Metoda × ekstrakt	7971,9	4	1993,0	515,3	0,0000 *	28,1 %
Omotač × ekstrakt	1897,6	4	474,4	122,7	0,0000 *	6,7 %
Metoda × omotač × ekstrakt	9098,3	8	1137,3	294,0	0,0000 *	32,0 %
Pogreška	104,4	27	3,9			
Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (elaginska kiselina)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	4355,4	2	2177,7	130,7	0,0000 *	10,2 %
Omotač	3256,9	2	1628,4	97,7	0,0000 *	7,6 %
Ekstrakt	19517,0	2	9758,5	585,7	0,0000 *	45,8 %
Metoda × omotač	1826,4	4	456,6	27,4	0,0000 *	4,3 %
Metoda × ekstrakt	9051,8	4	2262,9	135,8	0,0000 *	21,3 %
Omotač × ekstrakt	173,7	4	43,4	2,6	0,0580 ^{ns}	
Metoda × omotač × ekstrakt	3955,1	8	494,4	29,7	0,0000 *	9,3 %
Pogreška	449,8	27	16,7			
Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (o-kumarinska kiselina)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	6914926	2	3457463	1668,7	0,0000 *	55,5 %
Omotač	1013365	2	506683	244,6	0,0000 *	8,1 %
Ekstrakt	1238892	2	619446	299,0	0,0000 *	10,0 %
Metoda × omotač	1632180	4	408045	196,9	0,0000 *	13,1 %
Metoda × ekstrakt	1260133	4	315033	152,1	0,0000 *	10,1 %
Omotač × ekstrakt	163934	4	40983	19,8	0,0000 *	1,3 %
Metoda × omotač × ekstrakt	171743	8	21468	10,4	0,0000 *	1,4 %

Pogreška	55941	27	2072			
Faktorski ANOVA test za BI (katehin)						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	833,3	2	416,6	334,1	0,0000 *	10,2 %
Omotač	728,3	2	364,1	292,0	0,0000 *	8,9 %
Ekstrakt	1605,3	2	802,7	643,7	0,0000 *	19,7 %
Metoda × omotač	606,2	4	151,5	121,5	0,0000 *	7,4 %
Metoda × ekstrakt	1666,5	4	416,6	334,1	0,0000 *	20,5 %
Omotač × ekstrakt	1456,6	4	364,1	292,0	0,0000 *	17,9 %
Metoda × omotač × ekstrakt	1212,3	8	151,5	121,5	0,0000 *	14,9 %
Pogreška	33,7	27	1,2			
Faktorski ANOVA test za BI (epikatehin)						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	1119422	2	559711	6777,8	0,0000 *	50,6 %
Omotač	44534	2	22267	269,6	0,0000 *	2,0 %
Ekstrakt	514213	2	257107	3113,4	0,0000 *	23,3 %
Metoda × omotač	151956	4	37989	460,0	0,0000 *	6,9 %
Metoda × ekstrakt	250667	4	62667	758,9	0,0000 *	11,3 %
Omotač × ekstrakt	40326	4	10081	122,1	0,0000 *	1,8 %
Metoda × omotač × ekstrakt	88126	8	11016	133,4	0,0000 *	4,0 %
Pogreška	2230	27	83			
Faktorski ANOVA test za BI (epikatehin galat)						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	5976449	2	2988225	4821,9	0,0000 *	32,8 %
Omotač	1973630	2	986815	1592,4	0,0000 *	10,8 %
Ekstrakt	4673934	2	2336967	3771,0	0,0000 *	25,6 %
Metoda × omotač	1337677	4	334419	539,6	0,0000 *	7,3 %
Metoda × ekstrakt	1724455	4	431114	695,7	0,0000 *	9,5 %
Omotač × ekstrakt	999935	4	249984	403,4	0,0000 *	5,5 %
Metoda × omotač × ekstrakt	1525161	8	190645	307,6	0,0000 *	8,4 %
Pogreška	16732	27	620			
Faktorski ANOVA test za BI (galokatehin galat)						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	1221390	2	610695	2057,8	0,0000 *	9,1 %
Omotač	4313562	2	2156781	7267,5	0,0000 *	32,3 %
Ekstrakt	4770990	2	2385495	8038,1	0,0000 *	35,7 %
Metoda × omotač	445910	4	111478	375,6	0,0000 *	3,3 %
Metoda × ekstrakt	1271796	4	317949	1071,4	0,0000 *	9,5 %
Omotač × ekstrakt	836302	4	209075	704,5	0,0000 *	6,3 %
Metoda × omotač × ekstrakt	480805	8	60101	202,5	0,0000 *	3,6 %
Pogreška	8013	27	297			
Faktorski ANOVA test za BI (procijanidin B1)						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	62142,9	2	31071,4	2027,4	0,0000 *	48,2 %
Omotač	3946,5	2	1973,3	128,8	0,0000 *	3,1 %
Ekstrakt	17416,4	2	8708,2	568,2	0,0000 *	13,5 %
Metoda × omotač	6932,2	4	1733,1	113,1	0,0000 *	5,4 %
Metoda × ekstrakt	32135,6	4	8033,9	524,2	0,0000 *	24,9 %
Omotač × ekstrakt	2236,3	4	559,1	36,5	0,0000 *	1,7 %
Metoda × omotač × ekstrakt	3669,3	8	458,7	29,9	0,0000 *	2,8 %
Pogreška	413,8	27	15,3			
Faktorski ANOVA test za BI (procijanidin B2)						
Izvor varijacije	SS	df	MS	F	p	Veličina efekta
Metoda	8601,0	2	4300,5	788,7	0,0000 *	5,1 %
Omotač	16919,0	2	8459,5	1551,5	0,0000 *	10,1 %
Ekstrakt	24231,3	2	12115,6	2222,0	0,0000 *	14,5 %
Metoda × omotač	22779,8	4	5695,0	1044,5	0,0000 *	13,6 %
Metoda × ekstrakt	18516,1	4	4629,0	849,0	0,0000 *	11,1 %
Omotač × ekstrakt	25985,7	4	6496,4	1191,5	0,0000 *	15,5 %
Metoda × omotač × ekstrakt	50286,4	8	6285,8	1152,8	0,0000 *	30,0 %
Pogreška	147,2	27	5,5			

Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (oenin klorid)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	5081,0	2	2540,5	459,0	0,0000 *	37,1 %
Omotač	940,6	2	470,3	85,0	0,0000 *	6,9 %
Ekstrakt	1404,3	2	702,1	126,9	0,0000 *	10,3 %
Metoda × omotač	2171,2	4	542,8	98,1	0,0000 *	15,9 %
Metoda × ekstrakt	2184,9	4	546,2	98,7	0,0000 *	16,0 %
Omotač × ekstrakt	709,2	4	177,3	32,0	0,0000 *	5,2 %
Metoda × omotač × ekstrakt	1039,0	8	129,9	23,5	0,0000 *	7,6 %
Pogreška	149,4	27	5,5			

Faktorski ANOVA test za <i>BI</i> (peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid)						
Izvor varijacije	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Veličina efekta
Metoda	138,7	2	69,3	3016,2	0,0000 *	12,5 %
Omotač	174,2	2	87,1	3789,8	0,0000 *	15,7 %
Ekstrakt	56,1	2	28,1	1220,3	0,0000 *	5,1 %
Metoda × omotač	277,3	4	69,3	3016,2	0,0000 *	25,0 %
Metoda × ekstrakt	116,5	4	29,1	1266,9	0,0000 *	10,5 %
Omotač × ekstrakt	112,2	4	28,1	1220,3	0,0000 *	10,1 %
Metoda × omotač × ekstrakt	233,0	8	29,1	1266,9	0,0000 *	21,0 %
Pogreška	0,6	27	0,0			

* statistički značajno ($p < 0,05$); ^{ns} nije statistički značajno ($p > 0,05$)

Faktorski ANOVA test (**Tablica 4.45**) pokazuje da su sva tri faktora (metoda inkapsulacije, omotač, ekstrakt) kao i njihove interakcije (osim interakcije omotač-ekstrakt kod elaginske kiseline) imali statistički značajan utjecaj na biodostupnost pojedinačnih fenolnih spojeva. Pri tome je ekstrakt imao najveći utjecaj na varijabilnost *BI* vrijednosti vanilinske kiseline, elaginske kiseline, katehina, galokatehin galata, procijanidina B2 (14,15 – 45,8 % varijance). Metoda inkapsulacije je najviše utjecala na varijabilnost *BI* kod galne kiseline, *o*-kumarinske kiseline, epikatehina, epikatehin galata, procijanidina B1 i oenin klorida (29,6 % – 55,5 %) dok je omotač najviše utjecao na varijabilnost *BI* kod 3,4-dihidroksi-benzojeve kiseline, siringinske kiseline i peonidin-3-*O*-glukozid klorida (12,7 % – 15,7 %). Od svih interakcija dva faktora najveći utjecaj na varijabilnost *BI* vrijednosti većine pojedinačnih fenola imala je interakcija metode i ekstrakta (9,5% – 24,9 %). S druge strane interakcija sva tri faktora je utjecala sa 1,4 – 32 % na varijabilnost podataka za *BI* svih fenolnih spojeva. Galna kiselina, 3,4-dihidroksi-benzojeve kiselina, *o*-kumarinska kiselina, katehin, epikatehin, epikatehin galat i galokatehin galat imali su najveću biodostupnost iz inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem; peonidin-3-*O*-glukozid klorid iz inkapsulata dobivenih sušenjem zamrzavanjem; a vanilinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, procijanidini B1 i B2 te oenin klorid su pokazali najbolju biodostupnost iz inkapsulata dobivenih sušenjem raspršivanjem. Inkapsulati pripremljeni s omotačem NA-ŽEL su za većinu fenolnih spojeva imali najveće *BI* vrijednosti, osim vanilinske kiseline, siringinske kiseline te procijanidina B1 i B2 kod kojih je *BI* bio najveći iz NA-GA inkapsulata te kod peonidin-3-*O*-glukozid klorida čiji je *BI* bio najveći kod NA inkapsulata. Inkapsulati M ekstrakta imali su najveće vrijednosti *BI* za većinu fenolnih spojeva

dok su *BI* vrijednosti za 3,4-dihidroksi-benzojeve kiseline bile najveće za CF inkapsulate, a za galnu kiselinu, vanilinsku kiselinu, epikatehin, galokatehin, procijanidin B1 najveće *BI* vrijednosti su ostvarene iz CS inkapsulata (**Tablica 4.44**). Navedeni rezultati potvrđuju važnost utjecaja interakcije ispitivanih faktora na *BI* vrijednosti prikazanu u **Tablici 4.45**.

ZA OCJENU

ZA OCENU

5. ZAKLJUČCI

Rezultati provedenog istraživanja doprinijeli su ostvarenju postavljenih ciljeva doktorskog rada na temelju čega su doneseni slijedeći zaključci:

- optimalni uvjeti konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije za postizanje maksimalnog prinosa ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina iz tropa grožđa cabernet sauvignon su 50 %-tna vodene otopina etanola kao otapalo, omjer tekuće/kruto 40 mL/g i temperatura 80 °C;
- razvijen je proces inkapsulacije ekstrakta tropa grožđa ionskim geliranjem uz primjenu različitih omotača prirodnog porijekla gdje su izvedeni slijedeći zaključci:
 - optimalni uvjeti za postizanje maksimalne učinkovitosti inkapsulacije ekstrakta cabernet sauvignon ionskim geliranjem su: koncentracija natrijevog alginata od 3 % (w/v), koncentracija kalcijevog klorida od 0,25 M i vrijeme umrežavanja od 10 minuta,
 - vrsta omotača (natrij alginat i njegove kombinacije s gumom arabikom, gumom tragacanth, maltodekstrinima, kitozanom ili želatinom) i metoda sušenja hidrogelova značajno utječu na geometrijske parametre, teksturu, morfologiju inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem te na profil *in vitro* otpuštanja fenolnih spojeva tijekom simulirane probave iz inkapsulata. Nakon sveobuhvatne karakterizacije inkapsulata odabrani su omotači NA, NA-ŽEL i NA-GA koji su korišteni i za ostale dvije metode inkapsulacije (sušenje zamrzavanjem i sušenje raspršivanjem),
 - NA-ŽEL_{IG} inkapsulati pokazali su najpovoljniji profil otpuštanja koji uključuje postepeno otpuštanje fenolnih spojeva tijekom probave uz najveće otpuštanje fenolnih spojeva u crijevnoj fazi što osigurava veću biodostupnost fenolnih spojeva,
 - za stabilizaciju hidrogelova proizvedenih ionskim geliranjem sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) pokazalo se prikladnije u odnosu na sušenje na zraku i sušenje pod vakuumom, jer je uzrokovala najmanje promjene u morfologiji i veličini inkapsulata te omogućila najveće kumulativno otpuštanje ukupnih fenolnih spojeva iz inkapsulata.

Zaključci izvedeni nakon provedbe sve tri metode inkapsulacije (ionskim geliranjem, sušenjem zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem) su slijedeći:

- izgled, veličina i morfologija dobivenih inkapsulata razlikovao se s obzirom na metodu inkapsulacije pa je ionsko geliranje i sušenje raspršivanjem dalo inkapsulate približno sferičnog oblika uz veće čestice kod ionskog geliranja, dok je kod sušenja zamrzavanjem oblik i veličina čestica bila ovisna o naknadnom usitnjavanju (čestice u obliku „tankih listića“);
- inkapsulati pripremljeni s NA, NA-ŽEL i NA-GA omotačima imali su amorfnu strukturu za razliku od kristalne strukture ekstrakata što pogoduje boljoj stabilnosti te boljoj topljivosti i biodostupnosti fenolnih tvari ekstrakata;
- difuzija je prevladavajući mehanizam otpuštanja fenolnih spojeva iz svih inkapsulata, koja je bila uvjetovana kombinacijom fizikalnih, strukturnih i morfoloških svojstva inkapsulata. Kinetika otpuštanja fenolnih spojeva iz inkapsulata u većini slučajeva opisana je Korsmeyer–Peppas modelom ili modelom prvog reda osim za NA-ŽEL inkapsulate dobivene ionskim geliranjem i sušenjem raspršivanjem gdje se kao najprikladniji matematički model pokazao Higuchi model što upućuje na postupno otpuštanje iz inkapsulata uvjetovano strukturom omotača koje se povezuje s pH-osjetljivošću i bubrenjem želatine u uvjetima crijevne faze, povećavanjem propusnosti i oslobađanjem fenolnih spojeva;
- kombinacija NA i drugog omotača bez obzira na metodu inkapsulacije rezultirala je većom učinkovitosti inkapsulacije fenolnih spojeva u odnosu na čisti NA pri čemu je učinkovitost bila najveća kod svih NA-ŽEL inkapsulata s maksimalnim povećanjem do 2,1 puta u odnosu na NA inkapsulate (kod ionskog geliranja), što se može pripisati interakcijama fenolnih spojeva s proteinima (želatina) putem vodikovih veza, elektrostatskih i hidrofobnih interakcija;
- pojedini fenolni spojevi (galokatehin galat, *o*-kumarinsku kiselinu i epikatehin galat) pokazuju izraženiji porast biodostupnosti nakon simulirane probave *in vitro* u odnosu na ostale fenolne spojeve, što upućuje na zaštitni učinak inkapsulacije i vjerojatnu razgradnju složenijih spojeva u jednostavnije fenolne spojeve tijekom probave;
- inkapsulacija svim metodama doprinijela je povećanju *BI* u odnosu na neinkapsulirane ekstrakte pri čemu su postignuta maksimalna povećanja kako slijedi:

- do 5,8 puta za ukupne fenolne spojeve kod sušenja zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem,
 - do 3,9 puta za ukupne flavonoide kod sušenja zamrzavanjem i sušenjem raspršivanjem,
 - do 4,1 puta za ukupne proantocijanidine kod sušenja raspršivanjem,
 - do 34,2 puta za pojedinačne fenolne spojeve (epikatehin) kod ionskog geliranja;
- Uspoređene su vrijednosti *BI* fenolnih spojeva iz inkapsulata dobivenih trima metodama inkapsulacije te su izvedeni slijedeći zaključci:
- *BI* ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva iz inkapsulata ovisi o omotaču, ekstraktu i metodi inkapsulacije te njihovoj interakciji odnosno djelovanje jednog faktora ovisilo je o utjecaju preostala dva faktora,
 - omotač je imao dominantan utjecaj na *BI* svih ukupnih fenolnih spojeva dok je dominacija utjecaja pojedinog faktora (omotač, metoda, ekstrakt) na *BI* pojedinačnih fenolnih spojeva ovisila o fenolnom spoju,
 - ionskim geliranjem je postignut najveći *BI* kod ukupnih flavonoida, ukupnih proantocijanidina, katehina, epikatehina, epikatehin galata, galokatehin galata te kod galne, 3,4-dihidroksibenzojeve i *o*-kumarinske kiseline,
 - sušenjem zamrzavanjem je postignut najveći *BI* kod ukupnih flavonoida i peonidin-3-*O*-glukozid klorida,
 - sušenjem raspršivanjem je postignut najveći *BI* kod procijanidina B1 i B2, oenin klorida te kod vanilinske, siringinske i elaginske kiseline,
 - s obzirom na korišteni omotač najviši *BI* kod svih ukupnih fenolnih spojeva i većine pojedinačnih fenolnih spojeva ostvaren je iz NA-ŽEL inkapsulata,
 - s obzirom na korišteni ekstrakt najviši *BI* ukupnih fenolnih spojeva bio je ostvaren kod CS inkapsulata, najviši *BI* ukupnih flavonoida i ukupnih proantocijanidina kod CS i CF inkapsulata, a M inkapsulati su imali najveće vrijednosti *BI* većine pojedinačnih fenolnih spojeva.

Slijedom navedenih zaključaka potvrđene su pomoćne hipoteze doktorskog rada kako slijedi:

- trop grožđa, koji zaostaje kao proizvodni ostatak vinarija, moguće je iskoristiti za proizvodnju biološki aktivnih ekstrakata bogatih fenolnim spojevima;
- stabilnost fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa moguće je očuvati inkapsulacijom;
- inkapsulacija poboljšava funkcionalna svojstva ekstrakata;
- metoda inkapsulacije i omotači utječu na učinkovitost inkapsulacije i otpuštanje fenolnih spojeva u probavnom sustavu.

Sve prethodno navedeno potvrđuje i glavnu hipotezu doktorskog rada, koja glasi:

Inkapsulacija ionskim geliranjem povećava biodostupnost fenolnih spojeva iz ekstrakata tropa grožđa tijekom *in vitro* probave. Također i ostale dvije ispitivane metoda inkapsulacije doprinijele su povećanju biodostupnosti što sugerira da se odabirom metode i omotača može postići željeni učinak s obzirom na povećanje biodostupnosti ukupnih ili pojedinačnih fenolnih spojeva u odnosu na neinkapsulirane ekstrakte.

Znanstveni doprinos ovog doktorskog rada ogleda se u razvoju procesa inkapsulacije ekstrakata tropa grožđa uz primjenu različitih omotača prirodnog porijekla, s ciljem očuvanja stabilnosti i poboljšanja biodostupnosti fenolnih spojeva u probavnom sustavu. Karakterizacija inkapsulata i primjena prikladnih matematičkih modela za opisivanje kinetike otpuštanja fenolnih spojeva u uvjetima *in vitro* simulirane probave pridonijet će boljem razumijevanju složenih mehanizama probave koji utječu na biodostupnost fenolnih spojeva u probavnom sustavu. Predviđanje kinetike otpuštanja inkapsulirane aktivne tvari odgovarajućim matematičkim modelom može doprinijeti odabiru odgovarajućeg omotača za postizanje određene brzine otpuštanja aktivne tvari te prilagođavanju doze aktivne tvari u konačnoj formulaciji hrane ili dodataka prehrani.

ZA OCJENU

6. LITERATURA

- Abace, A., Mohammadian, M. i Jafari, S. M. (2017) 'Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems', *Trends in Food Science & Technology*, 70, str. 69–81. doi: 10.1016/j.tifs.2017.10.011.
- Abdin, M., Salama, M. A., Riaz, A., Akhtar, H. M. S. i Elsanat, S. Y. (2021) 'Enhanced the entrapment and controlled release of *Syzygium cumini* seeds polyphenols by modifying the surface and internal organization of alginate-based microcapsules', *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1). doi: 10.1111/jfpp.15100.
- Acun, S. i Gül, H. (2014) 'Effects of grape pomace and grape seed flours on cookie quality', *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(1), str. 81–88. doi: 10.3920/QAS2013.0264.
- Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N. i Usobiaga, A. (2016) 'Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes', *Food Chemistry*, 190, str. 614–621. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.117.
- Akhavan Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpoor, E. i Dehnad, D. (2016) 'Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin', *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, str. 379–385. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011.
- Alarcón, E., Hernández, C., García, G., Ziarelli, F., Gutiérrez-Rivera, B., Musule, R., Vázquez-Marrufo, G. i Gardner, T. G. (2022) 'Changes in chemical and structural composition of sugarcane bagasse caused by alkaline pretreatments [Ca(OH)₂ and NaOH] modify the amount of endoglucanase and β -glucosidase produced by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation', *Chemical Engineering Communications*, 209(5), str. 594–606. doi: 10.1080/00986445.2021.1881777.
- Ali, O., Hashem, Y., Bekhit, A., Khattab, S., Elkhodairy, K., Freag, M. i Elzoghby, A. (2019) 'Nanostructures of gelatin for encapsulation of food ingredients' u Jafari, S.M. (ur.) *Biopolymer nanostructures for food encapsulation purposes*. Massachusetts, SAD: Academic Press, str. 189–216.
- Alminger, M., Aura, A. -M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T. i Santos, C. N. (2014) 'In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), str. 413–436. doi: 10.1111/1541-4337.12081.
- Amienyo, D., Camilleri, C. i Azapagic, A. (2014) 'Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK', *Journal of Cleaner Production*, 72, str. 110–119. doi: 10.1016/j.jclepro.2014.02.044.
- Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I. i Martino, M. N. (2011) 'Yerba Mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: Interactions between active compound encapsulation polymers', *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 01(04), str. 80–87. doi: 10.4236/jeas.2011.14011.

- Anderson, J. W. (2004) 'Whole grains and coronary heart disease: the whole kernel of truth', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), str. 1459–1460. doi: 10.1093/ajcn/80.6.1459.
- Anirudhan, T. S. i Mohan, A. M. (2014) 'Novel pH switchable gelatin based hydrogel for the controlled delivery of the anti cancer drug 5-fluorouracil', *RSC Advances*, 4(24), str. 12109. doi: 10.1039/c3ra47991a.
- Antigo, J. L. D., Bergamasco, R. D. C. i Madrona, G. S. (2017) 'Effect of pH on the stability of red beet extract (*Beta vulgaris* L) microcapsules produced by spray drying or freeze drying', *Food Science and Technology*, 38(1), str. 72–77. doi: 10.1590/1678-457x.34316.
- Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D. i Tremlová, B. (2020) 'Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis', *Foods*, 9(11), str. 1627. doi: 10.3390/foods9111627.
- AOAC (1995) 'AOAC Official Method 942.05', u *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Arlington, VA, SAD: AOAC International.
- AOAC (2005a) 'AOAC Official Method 945.16', u *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Gaithersburg, MD, SAD: AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC (2005b) 'AOAC Official Method 2001.11', u *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Gaithersburg, MD, SAD: AOAC INTERNATIONAL.
- Aoki, T., Akashi, T. i Ayabe, S. (2000) 'Flavonoids of leguminous plants: Structure, biological activity, and biosynthesis', *Journal of Plant Research*, 113(4), str. 475–488. doi: 10.1007/PL00013958.
- Apoorva, A., Rameshbabu, A. P., Dasgupta, S., Dhara, S. i Padmavati, M. (2020) 'Novel pH-sensitive alginate hydrogel delivery system reinforced with gum tragacanth for intestinal targeting of nutraceuticals', *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, str. 675–687. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.027.
- Arab, K., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A. i Jahanbin, K. (2021) 'Extraction, purification, physicochemical properties and antioxidant activity of a new polysaccharide from *Ocimum album* L seed', *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, str. 643–653. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.088.
- Archana, G., Sabina, K., Babuskin, S., Radhakrishnan, K., Fayidh, M. A., Babu, P. A. S., Sivarajan, M. i Sukumar, M. (2013) 'Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications', *Carbohydrate Polymers*, 98(1), str. 89–94. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.062.
- Arianto, A., Bangun, H., Harahap, U. i Ilyas, S. (2015) 'Effect of alginate chitosan ratio on the swelling, mucoadhesive, and release of ranitidine from spherical matrices of alginate-chitosan', *International Journal of PharmTech Research*, 8(4), str. 653–665.
- Asghari-Varzaneh, E., Sharifian-Mobarakeh, S. i Shekarchizadeh, H. (2024) 'Enhancing hamburger shelf life and quality using gallic acid encapsulated in gelatin/tragacanth

- gum complex coacervate', *Heliyon*, 10(2), str. e24917. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e24917.
- Assadpour, E., Jafari, S.-M. i Maghsoudlou, Y. (2017) 'Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules', *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, str. 238–247. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.023.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R. i Simal-Gándara, J. (2009) 'A review on the use of cyclodextrins in foods', *Food Hydrocolloids*, 23(7), str. 1631–1640. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.01.001.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M. i Monzani, A. (1997) 'Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins', *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), str. 166–172. doi: 10.1006/jfca.1997.0528.
- Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A. i Cerqueira, M. A. (2014) 'Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2', *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, str. 141–146. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036.
- Bajpai, S. K. i Sharma, S. (2004) 'Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions', *Reactive and Functional Polymers*, 59(2), str. 129–140. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002.
- Bakowska-Barczak, A. M. i Kolodziejczyk, P. P. (2011) 'Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation', *Industrial Crops and Products*, 34(2), str. 1301–1309. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.10.002.
- Balan, V., Chiaramonti, D. i Kumar, S. (2013) 'Review of US and EU initiatives toward development, demonstration, and commercialization of lignocellulosic biofuels', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(6), str. 732–759. doi: 10.1002/bbb.1436.
- Balanč, B., Kalušević, A., Drvenica, I., Coelho, M. T., Djordjević, V., Alves, V. D., Sousa, I., Moldão-Martins, M., Rakić, V., Nedović, V. i Bugarski, B. (2016) 'Calcium-alginate-inulin microbeads as carriers for aqueous carqueja extract: Alginate-inulin microbeads as carriers for aqueous carqueja extract', *Journal of Food Science*, 81(1), str. E65–E75. doi: 10.1111/1750-3841.13167.
- Balducci, A. G., Colombo, G., Corace, G., Cavallari, C., Rodriguez, L., Buttini, F., Colombo, P. i Rossi, A. (2011) 'Layered lipid microcapsules for mesalazine delayed-release in children', *International Journal of Pharmaceutics*, 421(2), str. 293–300. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.09.043.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A. i Mussatto, S. I. (2017) 'Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials', *Food Chemistry*, 237, str. 623–631. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.142.

- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K. i Ghosh, C. (2012) 'Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system', *Food & Function*, 3(6), str. 592. doi: 10.1039/c2fo00006g.
- Baral, N. R., Sundstrom, E. R., Das, L., Gladden, J., Eudes, A., Mortimer, J. C., Singer, S. W., Mukhopadhyay, A. i Scown, C. D. (2019) 'Approaches for more efficient biological conversion of lignocellulosic feedstocks to biofuels and bioproducts', *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(10), str. 9062–9079. doi: 10.1021/acssuschemeng.9b01229.
- Barra, P. A., Márquez, K., Gil-Castell, O., Mujica, J., Ribes-Greus, A. i Faccini, M. (2019) 'Spray-drying performance and thermal stability of L-ascorbic acid microencapsulated with sodium alginate and gum arabic', *Molecules*, 24(16), str. 2872. doi: 10.3390/molecules24162872.
- Beecher, G. R. (2004) 'Proanthocyanidins: Biological Activities associated with human health', *Pharmaceutical Biology*, 42, str. 2–20.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Januário, M. I. N., Vicente, A. A., Beirão-da-Costa, M. L. i Delgadillo, I. (2013) 'Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of oregano essential oil', *Food Hydrocolloids*, 33(2), str. 199–206. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.03.009.
- Belščak-Cvitanović, A., Đorđević, V., Karlović, S., Pavlović, V., Komes, D., Ježek, D., Bugarski, B. i Nedović, V. (2015a) 'Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract', *Food Hydrocolloids*, 51, str. 361–374. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.05.039.
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Karlović, S., Djaković, S., Špoljarić, I., Mršić, G. i Ježek, D. (2015b) 'Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium', *Food Chemistry*, 167, str. 378–386. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.011.
- Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M. i Bertelli, D. (2004) 'Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of rubus, ribes, and aronia', *Journal of Food Science*, 69(3), str. FCT164–FCT169. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x.
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., Da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C. i Freitas, S. P. (2017) 'Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review', *Waste Management*, 68, str. 581–594. doi: 10.1016/j.wasman.2017.07.017.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. i Escalera, L. A. (2008) 'Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry', *Talanta*, 76(5), str. 965–977. doi: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- Biswas, S., Chattopadhyay, M., Sen, K. K. i Saha, M. K. (2015) 'Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice', *Carbohydrate Polymers*, 121, str. 403–410. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.044.

- Bohn, T. (2014) 'Dietary factors affecting polyphenol bioavailability', *Nutrition Reviews*, 72(7), str. 429–452. doi: 10.1111/nure.12114.
- Boostani, S. i Jafari, S. M. (2021) 'A comprehensive review on the controlled release of encapsulated food ingredients; fundamental concepts to design and applications', *Trends in Food Science & Technology*, 109, str. 303–321. doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.040.
- de Borba, V. S., Lemos, A. C., Rodrigues, M. H. P., Gropelli, V. M., Cerqueira, M. B. R. i Badiale-Furlong, E. (2022) 'Miniaturization of spectrophotometric methods to determine reducing sugars, total starch and soluble proteins in wheat-based products', *Food Analytical Methods*, 15(6), str. 2756–2766. doi: 10.1007/s12161-022-02330-2.
- Borrero-López, A. M., Masson, E., Celzard, A. i Fierro, V. (2018) 'Modelling the reactions of cellulose, hemicellulose and lignin submitted to hydrothermal treatment', *Industrial Crops and Products*, 124, str. 919–930. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.045.
- Botrel, D. A., De Barros Fernandes, R. V., Borges, S. V. i Yoshida, M. I. (2014) 'Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil', *Food Research International*, 62, str. 344–352. doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.003.
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L. i Bohn, T. (2012) 'Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs their native patterns', *Food Chemistry*, 131(4), str. 1466–1472. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.030.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), str. 248–254.
- Braga, A. R. C., Murador, D. C., De Souza Mesquita, L. M. i De Rosso, V. V. (2018) 'Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research', *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, str. 31–40. doi: 10.1016/j.jfca.2017.07.031.
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., De Freitas, V. i Soares, S. (2020) 'Inhibition mechanisms of wine polysaccharides on salivary protein precipitation', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), str. 2955–2963. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06184.
- Brazinha, C., Cadima, M. i Crespo, J. G. (2014) 'Optimization of extraction of bioactive compounds from different types of grape pomace produced at wineries and distilleries', *Journal of Food Science*, 79(6), str. E1142–E1149. doi: 10.1111/1750-3841.12476.
- Brezoiu, A.-M., Matei, C., Deaconu, M., Stanciuc, A.-M., Trifan, A., Gaspar-Pintilieșcu, A. i Berger, D. (2019) 'Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices', *Food and Chemical Toxicology*, 133, str. 110787. doi: 10.1016/j.fct.2019.110787.
- Brodkorb, A., Egger, L., Almingier, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont,

- D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A. R., Martins, C., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C. N., Souchon, I., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. i Recio, I. (2019) 'INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocols*, 14(4), str. 991–1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.
- Bruschi, M. L. (2015) *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. doi: 10.1016/C2014-0-02342-8.
- Bucić-Kojić, A. (2008) *Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa*, Doktorska disertacija, Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. i Tišma M. (2017a) 'Trop grožđa - otpad i visokovrijedna sirovina' u Šbarić D. (ur.) *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*. Osijek, Republika Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 111–131.
- Bucić-Kojić, A., Šelo, G., Zelić, B., Planinić, M. i Tišma, M. (2017b) 'Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(3), str. 948–960. doi: 10.1007/s12010-016-2261-y.
- Bucić-Kojić, A., Tišma, M., Šelo, G., Grgić, J., Perković, G. i Planinić, M. (2022) 'Winery production residues as feedstocks within the biorefinery concept', *Engineering Power : Bulletin of the Croatian Academy of Engineering*, 17, str. 11–17.
- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. G. i Aboul-Enein, H. Y. (2015) 'X-Ray diffraction: Instrumentation and applications', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), str. 289–299. doi: 10.1080/10408347.2014.949616.
- Buszewski, B. i Szultka, M. (2012) 'Past, present, and future of solid phase extraction: A review', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), str. 198–213. doi: 10.1080/07373937.2011.645413.
- Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Kovač, V., Špoljarić, I., Mršić, G. i Komes, D. (2018) 'Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L) polyphenols using ionic gelation and new filler materials', *Food Research International*, 111, str. 244–255. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.034.
- Calani, L., Ounnas, F., Salen, P., Demeilliers, C., Bresciani, L., Scazzina, F., Brighenti, F., Melegari, C., Crozier, A., de Lorgeril, M. i Del Rio, D. (2014) 'Bioavailability and metabolism of hydroxycinnamates in rats fed with durum wheat aleurone fractions', *Food & Function*, 5, str. 1738–1746. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.012.
- Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C. i Tonon, R. V. (2018) 'Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional

- extraction methods', *Industrial Crops and Products*, 111, str. 86–91. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.012.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J. i Frígola, Ana. (2014) 'analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), str. 155–171. doi: 10.1111/1541-4337.12049.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J. i Queipo-Ortuño, M. I. (2013) 'Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), str. 1415–1422. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, Ma. D. L., Páez-Hernández, Ma. E., Rodríguez, J. A. i Galán-Vidal, C. A. (2009) 'Chemical studies of anthocyanins: A review', *Food Chemistry*, 113(4), str. 859–871. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
- Castellanos-Gallo, L., Ballinas-Casarrubias, L., Espinoza-Hicks, J. C., Hernández-Ochoa, L. R., Muñoz-Castellanos, L. N., Zermeno-Ortega, M. R., Borrego-Loya, A. i Salas, E. (2022) 'Grape pomace valorization by extraction of phenolic polymeric pigments: A review', *Processes*, 10(3), str. 469. doi: 10.3390/pr10030469.
- Castro, R. I., Morales-Quintana, L., Alvarado, N., Guzmán, L., Forero-Doria, O., Valenzuela-Riffo, F. i Laurie, V. F. (2021) 'Design and optimization of a self-assembling complex based on microencapsulated calcium alginate and glutathione (CAG) using response surface methodology', *Polymers*, 13(13), str. 2080. doi: 10.3390/polym13132080.
- Chagas, M. do S. S., Behrens, M. D., Moragas-Tellis, C. J., Penedo, G. X. M., Silva, A. R. i Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. (2022) 'Flavonols and flavones as potential anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial compounds', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, str. 1–21. doi: 10.1155/2022/9966750.
- Chan, L. W., Lim, L. T. i Heng, P. W. S. (2000) 'Microencapsulation of oils using sodium alginate', *Journal of Microencapsulation*, 17(6), str. 757–766.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. i Chern, J.-C. (2002) 'Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods', *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), str. 178–182.
- Chen, H. i Zhong, Q. (2015) 'A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil', *Food Hydrocolloids*, 43, str. 593–602. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.07.018.
- Ching, S. H., Bansal, N. i Bhandari, B. (2017) 'Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), str. 1133–1152. doi: 10.1080/10408398.2014.965773.
- Chuang, J.-J., Huang, Y.-Y., Lo, S.-H., Hsu, T.-F., Huang, W.-Y., Huang, S.-L. i Lin, Y.-S. (2017) 'Effects of pH on the shape of alginate particles and its release behavior', *International Journal of Polymer Science*, 2017, str. 1–9. doi: 10.1155/2017/3902704.

- Coimbra, P. P. S., Cardoso, F. D. S. N. i Gonçalves, É. C. B. D. A. (2021) 'Spray-drying wall materials: Relationship with bioactive compounds', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(17), str. 2809–2826. doi: 10.1080/10408398.2020.1786354.
- Colin, C., Akpo, E., Perrin, A., Cornu, D. i Cambedouzou, J. (2024) 'Encapsulation in alginates hydrogels and controlled release: An overview', *Molecules*, 29(11), str. 2515. doi: 10.3390/molecules29112515.
- Comunian, T. A. i Favaro-Trindade, C. S. (2016) 'Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review', *Food Hydrocolloids*, 61, str. 442–457. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.003.
- Corona, G., Vauzour, D., Amini, A. i Spencer, J. P. E. (2014) 'The impact of gastrointestinal modifications, blood-brain barrier transport, and intracellular metabolism on polyphenol bioavailability', u Watson, R. R., Preedy, V. R. i Zibadi, S. (ur.) *Polyphenols in Human Health and Disease*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, str. 591–604. doi: 10.1016/B978-0-12-398456-2.00044-X.
- Cortés-Morales, E. A., Mendez-Montecalvo, G. i Velazquez, G. (2021) 'Interactions of the molecular assembly of polysaccharide-protein systems as encapsulation materials A review', *Advances in Colloid and Interface Science*, 295, str. 102398. doi: 10.1016/j.cis.2021.102398.
- Cosme, F., Pinto, T. i Vilela, A. (2018) 'Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view', *Beverages*, 4(1), str. 22. doi: 10.3390/beverages4010022.
- Costa, C., Anselmo, H., Ferro, R., Matos, A. S., Casimiro, T. i Aguiar-Ricardo, A. (2022) 'Dry dosage forms of add-value bioactive phenolic compounds by supercritical CO₂-assisted spray-drying', *Molecules*, 27(6), str. 2001. doi: 10.3390/molecules27062001.
- Costa, J. R., Xavier, M., Amado, I. R., Gonçalves, C., Castro, P. M., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., Pastrana, L. i Pintado, M. E. (2021) 'Polymeric nanoparticles as oral delivery systems for a grape pomace extract towards the improvement of biological activities', *Materials Science and Engineering: C*, 119, str. 111551. doi: 10.1016/j.msec.2020.111551.
- Costa, P. i Sousa Lobo, J. M. (2001) 'Modeling and comparison of dissolution profiles', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), str. 123–133. doi: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
- Cotoras, M., Vivanco, H., Melo, R., Aguirre, M., Silva, E. i Mendoza, L. (2014) 'In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace', *Molecules*, 19(12), str. 21154–21167. doi: 10.3390/molecules191221154.
- Crozier, A., Del Rio, D. i Clifford, M. N. (2010) 'Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds', *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), str. 446–467. doi: 10.1016/j.mam.2010.09.007.

- Cupone, I. E., Sansone, A., Marra, F., Giori, A. M. i Jannini, E. A. (2022) 'Orodispersible film (ODF) platform based on maltodextrin for therapeutical applications', *Pharmaceutics*, 14(10), str. 2011. doi: 10.3390/pharmaceutics14102011.
- Ćeranić, A. (2016) *Izbor membranskih filtara za mjerenje otopljenog organskog ugljika*, Završni rad, Zagreb: Fakultet strojarstva i brodogradnje.
- Da Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiasi, R. C., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., Luz, S. R. D., D'Avila, R. F. i Rutz, J. K. (2013) 'Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan', *Industrial Crops and Products*, 46, str. 138–146. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.12.053.
- Dadi, D. W., Emire, S. A., Hagos, A. D. i Eun, J.-B. (2020) 'Physical and functional properties, digestibility, and storage stability of spray- and freeze-dried microencapsulated bioactive products from *Moringa stenopetala* leaves extract', *Industrial Crops and Products*, 156, str. 112891. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112891.
- Dadwal, V., Bhatt, S., Joshi, R. i Gupta, M. (2020) 'Development and characterization of controlled released polyphenol rich micro-encapsulate of *Murraya koenigii* bark extract', *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(5). doi: 10.1111/jfpp.14438.
- Dai, C., Chen, Y. i Liu, M. (2006) 'Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry', *Journal of Applied Polymer Science*, 99(4), str. 1795–1801. doi: 10.1002/app.22711.
- Dai, Y., Li, P., Zhang, J., Wang, A. i Wei, Q. (2008) 'Swelling characteristics and drug delivery properties of nifedipine-loaded pH sensitive alginate–chitosan hydrogel beads', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 86B(2), str. 493–500. doi: 10.1002/jbm.b.31046.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B. i Masella, R. (2010) 'Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies', *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), str. 1321–1342. doi: 10.3390/ijms11041321.
- Daud, N., 'Aliah, Sarbini, S. R., Babji, A. S., Mohamad Yusop, S. i Lim, S. J. (2019) 'Characterization of edible swiftlet's nest as a prebiotic ingredient using a simulated colon model', *Annals of Microbiology*, 69(12), str. 1235–1246. doi: 10.1007/s13213-019-01507-1.
- Davarcı, F., Turan, D., Ozcelik, B. i Poncelet, D. (2017) 'The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique', *Food Hydrocolloids*, 62, str. 119–127. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.029.
- Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J. i Gullón, P. (2017) 'The biorefinery concept for the industrial valorization of grape processing by-products', u Galanakis, . (ur.) *Handbook of Grape Processing By-Products*. London, UK: Elsevier, str. 29–53. doi: 10.1016/B978-0-12-809870-7.00002-8.
- De Souza, A. G., Cesco, C. T., De Lima, G. F., Artifon, S. E. S., Rosa, D. D. S. i Paulino, A. T. (2019) 'Arabic gum-based composite hydrogels reinforced with eucalyptus and pinus

- residues for controlled phosphorus release', *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, str. 33–42. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.106.
- De Souza, V. B., Thomazini, M., Balieiro, J. C. D. C. i Fávaro-Trindade, C. S. (2015) 'Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*)', *Food and Bioproducts Processing*, 93, str. 39–50. doi: 10.1016/j.fbp.2013.11.001.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. i Sikkema, J. (2010) 'Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components', *International Dairy Journal*, 20(4), str. 292–302. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008.
- De Wit, M., Heun, M. i Crookes, D. (2018) 'An overview of salient factors, relationships and values to support integrated energy-economic system dynamics modelling', *Journal of Energy in Southern Africa*, 29(4). doi: <http://dx.doi.org/10.17159/2413-3051/2018/v29i4a3417>.
- Del Borghi, A., Moreschi, L. i Gallo, M. (2020) 'Life cycle assessment in the food industry', u *The Interaction of Food Industry and Environment*. 1. izdanje. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, str. 63–118. doi: 10.1016/B978-0-12-816449-5.00003-5.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S. i Martino, M. N. (2008) 'Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*', *Carbohydrate Polymers*, 71(1), str. 126–134. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.05.030.
- Delaš, I. (2011) 'Benefits and hazards of fat-free diets', *Trends in Food Science & Technology*, 22(10), str. 576–582. doi: 10.1016/j.tifs.2011.08.008.
- Deng, Q., Penner, M. H. i Zhao, Y. (2011) 'Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins', *Food Research International*, 44(9), str. 2712–2720. doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.026.
- Devi, N. i Kakati, D. K. (2013) 'Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex', *Journal of Food Engineering*, 117(2), str. 193–204. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.02.018.
- Dos Santos, M. A. i Grenha, A. (2015) 'Polysaccharide nanoparticles for protein and peptide delivery', u Uversky, V. N. i Dunker, A. K. (ur.) *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, str. 223–261. doi: 10.1016/bs.apcsb.2014.11.003.
- Dragnet, K. I. i Taylor, C. (2011) 'Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications', *Food Hydrocolloids*, 25(2), str. 251–256. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.007.
- Drevelegka, I. i Goula, A. M. (2020) 'Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes', *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 149(1), str. 107845. doi: 10.1016/j.cep.2020.107845.
- Dwyer, K., Hosseinian, F. i Rod, M. (2014) 'The market potential of grape waste alternatives', *Journal of Food Research*, 3(2), str. 91. doi: 10.5539/jfr.v3n2p91.

- Eghbal, N. i Choudhary, R. (2018) 'Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems', *LWT - Food Science and Technology*, 90, str. 254–264. doi: 10.1016/j.lwt.2017.12.036.
- El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T. i Krisa, S. (2018) 'A review of dietary stilbenes: Sources and bioavailability', *Phytochemistry Reviews*, 17(5), str. 1007–1029. doi: 10.1007/s11101-018-9578-9.
- Elmas, A., Akyüz, G., Bergal, A., Andaç, M. i Andaç, Ö. (2020) 'Mathematical modelling of drug release', *Research on Engineering Structures and Materials*, 6(4), str. 327–350. doi: 10.17515/resm2020.178na0122.
- Essifi, K., Brahmi, M., Berraaouan, D., Ed-Daoui, A., El Bachiri, A., Fauconnier, M.-L. i Tahani, A. (2021) 'Influence of Sodium alginate concentration on microcapsules properties foreseeing the protection and controlled release of bioactive substances' *Journal of Chemistry*, str. 1–13. doi: 10.1155/2021/5531479.
- Etchepare, M. D. A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Wagner, R., Fries, L. L. M. i Menezes, C. R. D. (2015) 'Microencapsulation of probiotics using sodium alginate', *Ciência Rural*, 45(7), str. 1319–1326. doi: 10.1590/0103-8478cr20140938.
- Eurostat (2024) *Food waste and food waste prevention - estimates*. Eurostat - Statistics Explained. Dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Food_waste_and_food_waste_prevention_-_estimates.
- Fabroni, S., Ballistreri, G., Amenta, M., Romeo, F. V. i Rapisarda, P. (2016) 'Screening of the anthocyanin profile and *in vitro* pancreatic lipase inhibition by anthocyanin-containing extracts of fruits, vegetables, legumes and cereals: Anthocyanin-containing extracts as inhibitors of pancreatic lipase', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(14), str. 4713–4723. doi: 10.1002/jsfa.7708.
- Fang, Z. i Bhandari, B. (2010) 'Encapsulation of polyphenols – a review', *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), str. 510–523. doi: 10.1016/j.tifs.2010.08.003.
- Fang, Z. i Bhandari, B. (2012) 'Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation', u Garti, N. i McClements, D. J. (ur.) *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, str. 73–109. doi: 10.1533/9780857095909.2.73.
- FAO (2011) *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Rim, Italija: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dostupno na: <https://www.fao.org/4/mb060e/mb060e.pdf> (pristupljeno: 05.02.2023.).
- Farooq, S., Shah, M. A., Siddiqui, M. W., Dar, B. N., Mir, S. A. i Ali, A. (2020) 'Recent trends in extraction techniques of anthocyanins from plant materials', *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), str. 3508–3519. doi: 10.1007/s11694-020-00598-8.
- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A. i Netto, F. M. (2010) 'The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein

- hydrolysate', *Food Hydrocolloids*, 24(4), str. 336–340. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.012.
- Fernandes, A., Sousa, A., Azevedo, J., Mateus, N. i De Freitas, V. (2013) 'Effect of cyclodextrins on the thermodynamic and kinetic properties of cyanidin-3-*O*-glucoside', *Food Research International*, 51(2), str. 748–755. doi: 10.1016/j.foodres.2013.01.037.
- Ferreira, T. i Rasband, W. (2012) 'ImageJ user guide', . Dostupno na: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide> (pristupljeno: 28.4.2023).
- Fick, A. (1855) 'V. On liquid diffusion', *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 10(63), str. 30–39. doi: <https://doi.org/10.1080/14786445508641925>.
- Fidelis, M., De Moura, C., Kabbas Junior, T., Pap, N., Mattila, P., Mäkinen, S., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Tian, Y., Yang, B. i Granato, D. (2019) 'Fruit seeds as sources of bioactive compounds: Sustainable production of high value-added ingredients from by-products within circular economy', *Molecules*, 24(21), str. 3854. doi: 10.3390/molecules24213854.
- Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M., Arapitsas, P. i Bavaresco, L. (2013) 'Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), str. 19651–19669. doi: 10.3390/ijms141019651.
- Fuloria, S., Sekar, M., Khattulanuar, F. S., Gan, S. H., Rani, N. N. I. M., Ravi, S., Subramaniam, V., Jeyabalan, S., Begum, M. Y., Chidambaram, K., Sathasivam, K. V., Safi, S. Z., Wu, Y. S., Nordin, R., Maziz, M. N. H., Kumarasamy, V., Lum, P. T. i Fuloria, N. K. (2022) 'Chemistry, biosynthesis and pharmacology of viniferin: Potential resveratrol-derived molecules for new drug discovery, development and therapy', *Molecules*, 27(16), str. 5072. doi: 10.3390/molecules27165072.
- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J. i Rinaudo, M. (1999) 'Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods', *Biomaterials*, 20, str. 1427–1435.
- Gao, S. i Hu, M. (2010) 'Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(6), str. 550–567. doi: 10.2174/138955710791384081.
- Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C. i Cassano, A. (2015) 'Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L) solid wastes', *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), str. 1114–1122. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.024.
- Garrido, J. i Borges, F. (2013) 'Wine and grape polyphenols — A chemical perspective', *Food Research International*, 54(2), str. 1844–1858. doi: 10.1016/j.foodres.2013.08.002.
- Geng, W., Narron, R., Jiang, X., Pawlak, J. J., Chang, H., Park, S., Jameel, H. i Venditti, R. A. (2019) 'The influence of lignin content and structure on hemicellulose alkaline

- extraction for non-wood and hardwood lignocellulosic biomass', *Cellulose*, 26(5), str. 3219–3230. doi: 10.1007/s10570-019-02261-y.
- George, M. i Abraham, T. E. (2006) 'Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review', *Journal of Controlled Release*, 114(1), str. 1–14. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017.
- Georgiev, V., Ananga, A. i Tsoleva, V. (2014) 'Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals', *Nutrients*, 6(1), str. 391–415. doi: 10.3390/nu6010391.
- Gibson, L. J. (2012) 'The hierarchical structure and mechanics of plant materials', *Journal of The Royal Society Interface*, 9(76), str. 2749–2766. doi: 10.1098/rsif.2012.0341.
- Giuliani, C., Marzorati, M., Innocenti, M., Vilchez-Vargas, R., Vital, M., Pieper, D. H., Van De Wiele, T. i Mulinacci, N. (2016) 'Dietary supplement based on stilbenes: a focus on gut microbial metabolism by the *in vitro* simulator M-SHIME®', *Food & Function*, 7(11), str. 4564–4575. doi: 10.1039/C6FO00784H.
- Goering, H. i Soest, P. (1970) *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)*. Washington: U. S. Government Printing Office, Agricultural Research Service.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. i Palazón, J. (2013) 'Phenolic acids', u Ramawat, K.G. i Mérillon, J.M. (ur.) *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Berlin/Heidelberg, Njemačka: Springer, str. 1951–1973.
- González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C. i Femenia, A. (2014) 'Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L) – A response surface approach', *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), str. 2176–2184. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.01.021.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C. i Santos-Buelga, C. (2004) 'Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration', *Analytica Chimica Acta*, 513(1), str. 283–289. doi: 10.1016/j.aca.2003.10.019.
- Goszcz, K., Deakin, S. J., Duthie, G. G., Stewart, D. i Megson, I. L. (2017) 'Bioavailable concentrations of delphinidin and its metabolite, gallic acid, induce antioxidant protection associated with increased intracellular glutathione in cultured endothelial cells', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(1), str. 9260701. doi: 10.1155/2017/9260701.
- Gotoh, T., Honda, H., Shiragami, N. i Unno, H. (1991) 'Forced breakup of power-law fluid jet discharged from an orifice', *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 24(6), str. 798–801.
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M. i Bucić-Kojić, A. (2020) 'Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds', *Antioxidants*, 9(10), str. 923. doi: 10.3390/antiox9100923.

- Guan, Y. i Zhong, Q. (2015) 'The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum arabic', *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), str. 706–712. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.018.
- Guerrero, R. F., Biais, B., Richard, T., Puertas, B., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.-M. i Cantos-Villar, E. (2016) 'Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes', *Industrial Crops and Products*, 94, str. 884–892. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.055.
- Guerriero, G., Hausman, J., Strauss, J., Ertan, H. i Siddiqui, K. S. (2016) 'Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization', *Engineering in Life Sciences*, 16(1), str. 1–16. doi: 10.1002/elsc.201400196.
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.-M. i Blondin, B. (2007) 'Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A mutated *HXT3* Allele enhances fructose fermentation', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), str. 2432–2439. doi: 10.1128/AEM.02269-06.
- Guo, Y., Qiao, D., Zhao, S., Zhang, B. i Xie, F. (2021) 'Starch-based materials encapsulating food ingredients: Recent advances in fabrication methods and applications', *Carbohydrate Polymers*, 270, str. 118358. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118358.
- Güven, M., Aras, A. B., Topaloğlu, N., Özkan, A., Şen, H. M., Kalkan, Y., Okuyucu, A., Akbal, A., Gökmen, F. i Coşar, M. (2015) 'The protective effect of syringic acid on ischemia injury in rat brain', *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 45, str. 233–240. doi: 10.3906/sag-1402-71.
- Guzman-Villanueva, D., El-Sherbiny, I. M., Herrera-Ruiz, D. i Smyth, H. D. C. (2013) 'Design and *in vitro* evaluation of a new nano-microparticulate system for enhanced aqueous-phase solubility of curcumin', *BioMed Research International*, 2013, str. 1–9. doi: 10.1155/2013/724763.
- Hager, A.-S., Vallons, K. J. R. i Arendt, E. K. (2012) 'Influence of gallic acid and tannic acid on the mechanical and barrier properties of wheat gluten films', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(24), str. 6157–6163. doi: 10.1021/jf300983m.
- He, J. i Giusti, M. M. (2010) 'Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties', *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), str. 163–187. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100754.
- Heptinstall, S., May, J., Fox, S., Kwik-Urbe, C. i Zhao, L. (2006) 'Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: Recent *in vitro* and *ex vivo* studies in healthy adults', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47(Supplement 2), str. S197–S205. doi: 10.1097/00005344-200606001-00015.
- Higuchi, T. (1963) 'Mechanism of sustained-action medication Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(12), str. 1145–1149. doi: 10.1002/jps.2600521210.
- Higuchi, W. I. (1962) 'Analysis of data on the medicament release from ointments', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(8), str. 802–804. doi: 10.1002/jps.2600510825.

- Hixson, A. W. i Crowell, J. H. (1931) 'Dependence of reaction velocity upon surface and agitation', *Industrial & Engineering Chemistry*, 23(8), str. 923–931. doi: <https://doi.org/10.1021/ie50260a018>.
- Hollman, P. C. H. (2004) 'Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids', *Pharmaceutical Biology*, 42, str. 74–83.
- Imeson, A. (1992) 'Exudate gums', u Imeson, A. (ur.) *Thickening and gelling agents for food*. London, UK: Springer Science & Business Media, str. 66–97. Dostupno na: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-3552-2_4 (pristupljeno: 6.6.2022).
- Iora, S. R. F., Maciel, G. M., Zielinski, A. A. F., Da Silva, M. V., Pontes, P. V. D. A., Haminiuk, C. W. I. i Granato, D. (2015) 'Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace', *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), str. 62–69. doi: 10.1111/ijfs.12583.
- Jafari, S. M. (2020) *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier. doi: 10.1016/C2017-0-03560-7.
- Jakobek, L. (2015) 'Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins', *Food Chemistry*, 175, str. 556–567. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.013.
- Jia, Z., Dumont, M.-J. i Orsat, V. (2016) 'Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices', *Food Bioscience*, 15, str. 87–104. doi: 10.1016/j.fbio.2016.05.007.
- Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Bimbela, F., Gandía, L. M. i Ancín-Azpilicueta, C. (2020) 'Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges', *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(20), str. 2061–2108. doi: 10.1080/10643389.2019.1694819.
- Jin, Q., O'Hair, J., Stewart, A. C., O'Keefe, S. F., Neilson, A. P., Kim, Y.-T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G. i Huang, H. (2019) 'Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components', *Foods*, 8(12), str. 667. doi: 10.3390/foods8120667.
- Jolić, N. (2017) *Antioksidacijska aktivnost fenola: Interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline*, Završni rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet.
- Jørgensen, S. i Pedersen, L. J. T. (2018) *RESTART sustainable business model innovation*. 1. izdanje. Cham, Švicarska: Springer International Publishing.
- Jurgilevich, A., Birge, T., Kentala-Lehtonen, J., Korhonen-Kurki, K., Pietikäinen, J., Saikku, L. i Schösler, H. (2016) 'Transition towards circular economy in the food system', *Sustainability*, 8(1), str. 69. doi: 10.3390/su8010069.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S. i Srawan, G. Y. (2010) 'Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency', *Journal of Microencapsulation*, 27(3), str. 187–197. doi: 10.3109/02652040903131301.

- Kafali, M., Finos, M. A. i Tsoupras, A. (2024) 'Vanillin and its derivatives: A critical review of their anti-inflammatory, anti-infective, wound-healing, neuroprotective, and anti-cancer health-promoting benefits', *Nutraceuticals*, 4(4), str. 522–561. doi: 10.3390/nutraceuticals4040030.
- Kai, D., Tan, M. J., Chee, P. L., Chua, Y. K., Yap, Y. L. i Loh, X. J. (2016) 'Towards lignin-based functional materials in a sustainable world', *Green Chemistry*, 18(5), str. 1175–1200. doi: 10.1039/C5GC02616D.
- Kamonpatana, K., Failla, M. L., Kumar, P. S. i Giusti, M. M. (2014) 'Anthocyanin structure determines susceptibility to microbial degradation and bioavailability to the buccal mucosa', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), str. 6903–6910. doi: 10.1021/jf405180k.
- Kamonpatana, K., Giusti, M. M., Chitchumroonchokchai, C., Moreno Cruz, M., Riedl, K. M., Kumar, P. i Failla, M. L. (2012) 'Susceptibility of anthocyanins to *ex vivo* degradation in human saliva', *Food Chemistry*, 135(2), str. 738–747. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.110.
- Karewicz, A., Zasada, K., Bielska, D., Douglas, T. E. L., Jansen, J. A., Leeuwenburgh, S. C. G. i Nowakowska, M. (2014) 'Alginate-hydroxypropylcellulose hydrogel microbeads for alkaline phosphatase encapsulation', *Journal of Microencapsulation*, 31(1), str. 68–76. doi: 10.3109/02652048.2013.805841.
- Karewicz, A., Zasada, K., Szczubiałka, K., Zapotoczny, S., Lach, R. i Nowakowska, M. (2010) "'Smart" alginate-hydroxypropylcellulose microbeads for controlled release of heparin', *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1–2), str. 163–169. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.021.
- Kasote, D. M., Jayaprakasha, G. K. i Patil, B. S. (2018) 'Encapsulation of polyphenols: An effective way to enhance their bioavailability for gut health', u Jayaprakasha, G. K., Patil, B. S. i Gattuso, G. (ur.) *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*. Washington, SAD: American Chemical Society, str. 239–259. doi: 10.1021/bk-2018-1286.ch013.
- Keskin, M., Keskin, Ş. i Kolaylı, S. (2019) 'Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization and release property', *LWT - Food Science and Technology*, 108, str. 89–96. doi: 10.1016/j.lwt.2019.03.036.
- Kiliç, I. i Yeşiloğlu, Y. (2013) 'Spectroscopic studies on the antioxidant activity of *p*-coumaric acid', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, str. 719–724. doi: 10.1016/j.saa.2013.06.110.
- Kittur, F. S., Harish Prashanth, K. V., Udaya Sankar, K. i Tharanathan, R. N. (2002) 'Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry', *Carbohydrate Polymers*, 49(2), str. 185–193. doi: 10.1016/S0144-8617(01)00320-4.
- Ko, S. i Gunasekaran, S. (2014) 'Controlled release of food ingredients', u Kwak, H. (ur.) *Nano- and Microencapsulation for Foods*. Chichester, UK: Wiley, str. 325–343. doi: 10.1002/9781118292327.ch13.

- Kong, F. i Singh, R. P. (2010) 'A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach', *Journal of Food Science*, 75(9). doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x.
- Kőrösi, L., Molnár, S., Teszlák, P., Dörnyei, Á., Maul, E., Töpfer, R., Marosvölgyi, T., Szabó, É. i Röckel, F. (2022) 'Comparative study on grape berry anthocyanins of various Teinturier varieties', *Foods*, 11(22), str. 3668. doi: 10.3390/foods11223668.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. i Peppas, N. A. (1983) 'Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers', *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), str. 25–35. doi: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.
- Kowczyk-Sadowy, M., Świsłocka, R., Lewandowska, H., Piekut, J. i Lewandowski, W. (2015) 'Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H- and ¹³C-NMR), Theoretical and microbiological study of trans *o*-coumaric acid and alkali metal *o*-coumarates', *Molecules*, 20(2), str. 3146–3169. doi: 10.3390/molecules20023146.
- Kumar, N. i Goel, N. (2019) 'Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications', *Biotechnology Reports*, 24, str. e00370. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
- Kumar, S., Mukherjee, A. i Dutta, J. (2020) 'Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives', *Trends in Food Science & Technology*, 97, str. 196–209. doi: 10.1016/j.tifs.2020.01.002.
- Kumar, S. i Pandey, A. K. (2013) 'Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview', *The Scientific World Journal*, 2013(1), str. 162750. doi: 10.1155/2013/162750.
- Kurozawa, L. E. i Hubinger, M. D. (2017) 'Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation', *Current Opinion in Food Science*, 15, str. 50–55. doi: 10.1016/j.cofs.2017.06.004.
- Labuschagne, P. (2018) 'Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review', *Food Research International*, 107, str. 227–247. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.026.
- Laine, P., Kylli, P., Heinonen, M. i Jouppila, K. (2008) 'Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), str. 11251–11261. doi: 10.1021/jf801868h.
- Landete, J. M. (2012) 'Updated knowledge about polyphenols: Functions, bioavailability, metabolism, and health', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(10), str. 936–948.
- Lange, L., Bech, L., Busk, P. K., Grell, M. N., Huang, Y., Lange, M., Linde, T., Pilgaard, B., Roth, D. i Tong, X. (2012) 'The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy', *IMA Fungus*, 3(1), str. 87–92. doi: 10.5598/ima fungus.2012.03.01.09.

- Lee, H.-S., Yee, M. Q., Eckmann, Y. Y., Hickok, N. J., Eckmann, D. M. i Composto, R. J. (2012) 'Reversible swelling of chitosan and quaternary ammonium modified chitosan brush layers: Effects of pH and counter anion size and functionality', *Journal of Materials Chemistry*, 22(37), str. 19605. doi: 10.1039/c2jm34316a.
- Lee, M.-H., Kang, H., Lee, K., Yang, G., Ham, I., Bu, Y., Kim, H. i Choi, H.-Y. (2013) 'The aerial part of *Taraxacum coreanum* extract has an anti-inflammatory effect on peritoneal macrophages *in vitro* and increases survival in a mouse model of septic shock', *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), str. 1–8. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.009.
- Leong, K. W. i Langer, R. (1988) 'Polymeric controlled drug delivery', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1(3), str. 199–233. doi: 10.1016/0169-409X(88)90019-1.
- Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A. i Gorlach, S. (2013) 'Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), str. 12183–12199. doi: 10.1021/jf404439b.
- Li, Q., Duan, M., Hou, D., Chen, X., Shi, J. i Zhou, W. (2021) 'Fabrication and characterization of Ca(II)-alginate-based beads combined with different polysaccharides as vehicles for delivery, release and storage of tea polyphenols', *Food Hydrocolloids*, 112, str. 106274. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106274.
- Li, Y., Lim, L.-T. i Kakuda, Y. (2009) 'Electrospun zein fibers as carriers to stabilize (–)-epigallocatechin gallate', *Journal of Food Science*, 74(3), str. C233–C240. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01093.x.
- Li, Z., Jiang, H., Xu, C. i Gu, L. (2015) 'A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals', *Food Hydrocolloids*, 43, str. 153–164. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.05.010.
- Liang, J., Yan, H., Puligundla, P., Gao, X., Zhou, Y. i Wan, X. (2017) 'Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review', *Food Hydrocolloids*, 69, str. 286–292. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.01.041.
- Licá, I. C. L., Soares, A. M. D. S., De Mesquita, L. S. S. i Malik, S. (2018) 'Biological properties and pharmacological potential of plant exudates', *Food Research International*, 105, str. 1039–1053. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.051.
- Lin, C.-C. i Metters, A. T. (2006) 'Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12–13), str. 1379–1408. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.004.
- Liu, Y., Sun, C., Li, W., Adu-Frimpong, M., Wang, Q., Yu, J. i Xu, X. (2019) 'Preparation and characterization of syringic acid-loaded TPGS liposome with enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant efficiency', *AAPS PharmSciTech*, 20(3), str. 98. doi: 10.1208/s12249-019-1290-6.
- Lokhande, A. B., Mishra, S., Kulkarni, R. D. i Naik, J. B. (2013) 'Influence of different viscosity grade ethylcellulose polymers on encapsulation and *in vitro* release study of drug loaded nanoparticles', *Journal of Pharmacy Research*, 7(5), str. 414–420. doi: 10.1016/j.jopr.2013.04.050.

- Lokhandwala, H., Deshpande, A. i Deshpande, S. (2013) 'Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: An overview', *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), str. 728–737.
- López Córdoba, A., Deladino, L. i Martino, M. (2013) 'Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with *Yerba Mate* antioxidants', *Carbohydrate Polymers*, 95(1), str. 315–323. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.019.
- Lou, W., Li, B. i Nataliya, G. (2021) 'The influence of Cabernet Sauvignon wine grape pomace powder addition on the rheological and microstructural properties of wheat dough', *CyTA - Journal of Food*, 19(1), str. 751–761. doi: 10.1080/19476337.2021.1981458.
- Luchese, C. L., Uranga, J., Spada, J. C., Tessaro, I. C. i De La Caba, K. (2018) 'Valorisation of blueberry waste and use of compression to manufacture sustainable starch films with enhanced properties', *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, str. 955–960. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.162.
- Lukova, P., Katsarov, P. i Pilicheva, B. (2023) 'Application of starch, cellulose, and their derivatives in the development of microparticle drug-delivery systems', *Polymers*, 15(17), str. 3615. doi: 10.3390/polym15173615.
- Luo, Q. (2022) 'Gelatin-based composite films and their application in food packaging: A review', *Journal of Food Engineering*, 313, str. 110762.
- Luo, Y., Jian, Y., Liu, Y., Jiang, S., Muhammad, D. i Wang, W. (2022) 'Flavanols from nature: A Phytochemistry and biological activity review', *Molecules*, 27(3), str. 719. doi: 10.3390/molecules27030719.
- Luo, Y. i Wang, Q. (2013) 'Recent advances of chitosan and its derivatives for novel applications in food science', *Journal of Food Processing & Beverages*, 1(1), str. 13.
- Malekjani, N. i Jafari, S. M. (2021) 'Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), str. 3–47. doi: 10.1111/1541-4337.12660.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. i Jiménez, L. (2004) 'Polyphenols: food sources and bioavailability', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), str. 727–747. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
- Manca, D. i Rovaglio, M. (2003) 'Modeling the controlled release of microencapsulated drugs: theory and experimental validation', *Chemical Engineering Science*, 58(7), str. 1337–1351. doi: 10.1016/S0009-2509(02)00623-1.
- Manuja, R., Sachdeva, S., Jain, A. i Chaudhary, J. 'A comprehensive review on biological activities of *p*-hydroxy benzoic acid and its derivatives', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(2), str. 109–115.
- Mariod, A. A. (2018) 'Functional properties of gum arabic', u Mariod, A. A. (ur.) *Gum Arabic*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, str. 283–295. doi: 10.1016/B978-0-12-812002-6.00024-5.

- Marques, H. M. C. (2010) 'A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles', *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), str. 313–326. doi: 10.1002/ffj.2019.
- Martins, I. M., Roberto, B. S., Blumberg, J. B., Chen, C.-Y. O. i Macedo, G. A. (2016) 'Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace', *Food Research International*, 89, str. 533–539. doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.009.
- Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C. i De Freitas, V. (2004) 'Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein–tannin aggregates', *Analytica Chimica Acta*, 513(1), str. 135–140. doi: 10.1016/j.aca.2003.08.072.
- McClements, D. J. (2014) *Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds*. Boca Raton, Florida, SAD: CRC Press.
- McClements, D. J. (2017) 'Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects', *Advances in Colloid and Interface Science*, 240, str. 31–59. doi: 10.1016/j.cis.2016.12.005.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A. i Pacheco, N. (2017) 'Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources', *Agronomy*, 7(3), str. 47. doi: 10.3390/agronomy7030047.
- Metodiewa, D., Kochman, A. i Karolczak, S. (1997) 'Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-Diethylaminoethyl ethers of flavaone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid rutin action', *IUBMB Life*, 41(5), str. 1067–1075. doi: 10.1080/15216549700202141.
- Milaković, M. (2016) *Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija benzoilcikloheksanonskih i benzoilpirazolnog herbicida iz poljoprivrednog tla*, Diplomski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R. i Górecka, D. (2013) 'White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), str. 389–395. doi: 10.1002/jsfa.5774.
- Milinčić, D. D., Popović, D. A., Lević, S. M., Kostić, A. Ž., Tešić, Ž. Lj., Nedović, V. A. i Pešić, M. B. (2019) 'Application of polyphenol-loaded nanoparticles in food industry', *Nanomaterials*, 9(11), str. 1629. doi: 10.3390/nano9111629.
- Miller, G. L. (1959) 'Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar', *Analytical Chemistry*, 31(3), str. 426–428.
- Mishra, M. (2016) 'Materials of Natural Origin for Encapsulation', u Mishra, M. K. (ur.) *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. Boca Raton, Florida, SAD: CRC Press, Taylor & Francis Group, str. 493–509.

- Mohsenabadi, N., Rajaei, A., Tabatabaei, M. i Mohsenifar, A. (2018) 'Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel', *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, str. 148–155. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.034.
- Moreno, T., Cocero, M. J. i Rodríguez-Rojo, S. (2018) 'Storage stability and simulated gastrointestinal release of spray dried grape marc phenolics', *Food and Bioprocess Technology*, 112, str. 96–107. doi: 10.1016/j.fbp.2018.08.011.
- Morris, M. C. (2002) 'Dietary Intake of antioxidant nutrients and the risk of incident alzheimer disease in a biracial community study', *Journal of the American Medical Association*, 287(24), str. 3230. doi: 10.1001/jama.287.24.3230.
- Moschona, A. i Liakopoulou-Kyriakides, M. (2018) 'Encapsulation of biological active phenolic compounds extracted from wine wastes in alginate-chitosan microbeads', *Journal of Microencapsulation*, 35(3), str. 229–240. doi: 10.1080/02652048.2018.1462415.
- Motlagh, S., Ravines, P., Karamallah, K. A. i Ma, Q. (2006) 'The analysis of Acacia gums using electrophoresis', *Food Hydrocolloids*, 20(6), str. 848–854. doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.08.007.
- Munin, A. i Edwards-Lévy, F. (2011) 'Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review', *Pharmaceutics*, 3(4), str. 793–829. doi: 10.3390/pharmaceutics3040793.
- Muñoz, P., Morales, M. P., Mendivil, M. A., Juárez, M. C. i Muñoz, L. (2014) 'Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks eco-friendly way of building construction', *Construction and Building Materials*, 71, str. 181–187. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2014.08.027.
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Coria-Oliveros, A. J., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., del Rocío Martínez-Ruiz, N., Sayago-Ayerdi, S. G. i Alvarez-Parrilla, E. (2021) 'Cardioprotective effect of red wine and grape pomace', *Food Research International*, 140, str. 110069.
- Murmu, S. B. i Mishra, H. N. (2017) 'Optimization of the arabic gum based edible coating formulations with sodium caseinate and tulsi extract for guava', *LWT - Food Science and Technology*, 80, str. 271–279. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.018.
- Mutalik, S. P., Pandey, A. i Mutalik, S. (2020) 'Nanoarchitectonics: A versatile tool for deciphering nanoparticle interaction with cellular proteins, nucleic acids and phospholipids at biological interfaces', *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, str. 136–158. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.150.
- Naczki, M. i Shahidi, F. (2006) 'Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), str. 1523–1542. doi: 10.1016/j.jpba.2006.04.002.
- Nandakumar, V., Singh, T. i Katiyar, S. K. (2008) 'Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins', *Cancer Letters*, 269(2), str. 378–387. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.049.

- Narsaiah, K., Jha, S. N., Wilson, R. A., Mandge, H. M. i Manikantan, M. R. (2014) 'Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum', *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), str. 4054–4059. doi: 10.1007/s13197-012-0886-6.
- Nayak, A. K., Das, B. i Maji, R. (2012) 'Calcium alginate/gum arabic beads containing glibenclamide: Development and *in vitro* characterization', *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), str. 1070–1078. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.021.
- Nayak, A. K. i Pal, D. (2011) 'Development of pH-sensitive tamarind seed polysaccharide–alginate composite beads for controlled diclofenac sodium delivery using response surface methodology', *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4), str. 784–793. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.013.
- Nayak, A. i Pal, D. (2015) 'Plant-derived polymers: ionically-gelled sustained drug release systems', u Mishra, M. K. (ur.) *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Boca Raton, Florida, SAD: Taylor & Francis, str. 6002–6017. doi: 10.1081/E-EBPP.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. i Bugarski, B. (2011) 'An overview of encapsulation technologies for food applications', *Procedia Food Science*, 1, str. 1806–1815. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- Nejatian, M., Abbasi, S. i Azarikia, F. (2020) 'Gum Tragacanth: Structure, characteristics and applications in foods', *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, str. 846–860. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.214.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F. i Durrieu, V. (2013) 'Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness', *Industrial Crops and Products*, 42, str. 469–479. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.035.
- Nikitenko, N. A. i Prassolov, V. S. (2013) 'Non-viral delivery and therapeutic application of small interfering RNAs', *Acta Naturae*, 5(3), str. 35–53. doi: 10.32607/20758251-2013-5-3-35-53.
- Nistor, E., Dobrei, Alin, Dobrei, Alina, Bampidis, V. i Ciolac, V. (2014) 'Grape pomace in sheep and dairy cows feeding', *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 18(2), str. 146–150.
- Niwano, Y., Kohzaki, H., Shirato, M., Shishido, S. i Nakamura, K. (2022) 'Metabolic fate of orally ingested proanthocyanidins through the digestive tract', *Antioxidants*, 12(1), str. 17. doi: 10.3390/antiox12010017.
- Ogbonna, J. C., Matsumura, M., Yamagata, T., Sakuma, H. i Kataoka, H. (1989) 'Production of micro-gel beads by a rotating disk atomizer', *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68(1), str. 40–48. doi: 10.1016/0922-338X(89)90212-2.
- OIV (2023) *World Statistics*. Dostupno na: <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report?oiv> (pristupljeno: 20.12.2022)

- Olivas-Aguirre, F., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N., Cárdenas-Robles, A., Mendoza-Díaz, S., Álvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G., de la Rosa, L., Ramos-Jiménez, A. i Wall-Medrano, A. (2016) 'Cyanidin-3-*O*-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects', *Molecules*, 21(9), str. 1264. doi: 10.3390/molecules21091264.
- Oniszczyk, A. (2016) 'LC-ESI-MS/MS analysis and extraction method of phenolic acids from gluten-free precooked buckwheat pasta', *Food Analytical Methods*, 9(11), str. 3063–3068. doi: 10.1007/s12161-016-0489-3.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A. i Osorio, C. (2015) 'Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents', *Food Chemistry*, 187, str. 174–181. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.090.
- Ou, K. i Gu, L. (2014) 'Absorption and metabolism of proanthocyanidins', *Journal of Functional Foods*, 7, str. 43–53. doi: 10.1016/j.jff.2013.08.004.
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J. i Capanoglu, E. (2019) 'A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications', *Food Chemistry*, 272, str. 494–506. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.205.
- Özvural, E. B. i Vural, H. (2011) 'Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters', *Meat Science*, 88(1), str. 179–183. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.12.022.
- Paarakh, M. P., Jose, P. A., Setty, C. i Peter, G. V. (2018) 'Release kinetics - Concepts and applications', *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8, str. 12–20.
- Pagotto, M. i Halog, A. (2016) 'Towards a circular economy in Australian agri-food industry: An application of input-output oriented approaches for analyzing resource efficiency and competitiveness potential', *Journal of Industrial Ecology*, 20(5), str. 1176–1186. doi: 10.1111/jiec.12373.
- Pal, D. i Nayak, A. K. (2017) 'Plant polysaccharides blended ionotropically gelled alginate multiple unit systems for sustained drug release', u Thakur, V. K., Thakur, M. K., i Kessler, M. R. (ur.) *Handbook of Composites from Renewable Materials*. Wiley, str. 399–440. doi: 10.1002/9781119441632.ch119.
- Panche, A. N., Diwan, A. D. i Chandra, S. R. (2016) 'Flavonoids: an overview', *Journal of Nutritional Science*, 5, str. e47. doi: 10.1017/jns.2016.41.
- Papoutsis, K., Golding, J., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C., Scarlett, C. i Bowyer, M. (2018) 'Encapsulation of citrus by-product extracts by spray-drying and freeze-drying using combinations of maltodextrin with soybean protein and ι-carrageenan', *Foods*, 7(7), str. 115. doi: 10.3390/foods7070115.
- Paques, J. P., Van Der Linden, E., Van Rijn, C. J. M. i Sagis, L. M. C. (2014) 'Preparation methods of alginate nanoparticles', *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, str. 163–171. doi: 10.1016/j.cis.2014.03.009.

- Parikh, D. M. (2015) 'Vacuum drying: Basics and application', *Chemical Engineering*, 122(4), str. 48–54.
- Patel, S. i Goyal, A. (2015) 'Applications of natural polymer gum arabic: A review', *International Journal of Food Properties*, 18(5), str. 986–998. doi: 10.1080/10942912.2013.809541.
- Patil, J. S., Kamalapur, M. V., Marapur, S. C. i Kadam, D. V. (2010) 'Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review', *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), str. 241–248.
- Patzek, T. W. (2014) 'Fick's diffusion experiments revisited —Part II (english translation of Fick's original thinking)', *Advances in Historical Studies*, 03(04), str. 207–220. doi: 10.4236/ahs.2014.34018.
- Peppas, N. A. i Narasimhan, B. (2014) 'Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems', *Journal of Controlled Release*, 190, str. 75–81. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.041.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G. i Henriques, M. (2014) 'Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds', *Carbohydrate Polymers*, 101, str. 121–135. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.078.
- Poncelet, D. (2001) 'Production of alginate beads by emulsification/internal gelation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 944(1), str. 74–82. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03824.x.
- Poshadri, A. i Kuna, A. (2010) 'Microencapsulation technology: A review', *The Journal of Research ANGRAU*, 38(1), str. 86–102.
- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedovic, V., Poncelet, D., Siebenhaar, S., Tobler, L., Tosi, A., Vikartovská, A. i Vorlop, K.-D. (2008) 'Comparison of different technologies for alginate beads production', *Chemical Papers*, 62(4). doi: 10.2478/s11696-008-0035-x.
- Racoviță, Ș., Vasiliu, S., Popa, M. i Luca, C. (2009) 'Polysaccharide based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems', *Revue Roumaine de Chimie*, 54(9), str. 709–718.
- Ramachandran, V. i Raja, B. (2010) 'Protective effects of syringic acid against acetaminophen-induced hepatic damage in albino rats', *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 21(4). doi: 10.1515/JBCPP.2010.21.4.369.
- Ramos, O., Pereira, R., Simões, L., Madalena, D., Rodrigues, R., Teixeira, J. i Vicente, A. (2019) 'Biopolymer nanostructures for food encapsulation purposes', u Jafari, S. M. (ur.) *Nanoencapsulation in the food industry series*. Massachusetts, SAD: Academic Press, str. 69–100.

- Rashmi, H. B. i Negi, P. S. (2020) 'Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits', *Food Research International*, 136, str. 109298. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109298.
- Ravichai, K. i Muangratt, R. (2019) 'Effect of different coating materials on freeze-drying encapsulation of bioactive compounds from fermented tea leaf wastewater', *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, str. e1415.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. i Rice-Evans, C. (1999) 'Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), str. 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretti, L., Thakkar, S. K. i Da Silva Pinto, M. (2013) 'Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), str. 588–602. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Vilela, S., Ribeiro, A. J. i Veiga, F. (2006) 'Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles', *Journal of Microencapsulation*, 23(3), str. 245–257. doi: 10.1080/02652040500286086.
- Renaud, S. i de Lorgeril, M. (1992) 'Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease', *The Lancet*, 339(8808), str. 1523–1526. doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-F.
- Rezende, Y. R. R. S., Nogueira, J. P. i Narain, N. (2018) 'Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization', *Food Chemistry*, 254, str. 281–291. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.026.
- Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. i Elez-Martínez, P. (2018) 'Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), str. 2531–2548. doi: 10.1080/10408398.2017.1331200.
- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N. i Rocha, F. (2019) 'Spray drying encapsulation of elderberry extract and evaluating the release and stability of phenolic compounds in encapsulated powders', *Food and Bioprocess Technology*, 12(8), str. 1381–1394. doi: 10.1007/s11947-019-02304-z.
- Righi Da Rosa, J., Cezimbra Weis, G. C., Bolson Moro, K. I., Sasso Robalo, S., Elias Assmann, C., Picolli Da Silva, L., Irineu Muller, E., De Bona Da Silva, C., Ragagnin De Menezes, C. i Severo Da Rosa, C. (2021) 'Effect of wall materials and storage temperature on anthocyanin stability of microencapsulated blueberry extract', *LWT - Food Science and Technology*, 142, str. 111027. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111027.
- Robert, P. i Fredes, C. (2015) 'The encapsulation of anthocyanins from berry-type fruits: Trends in foods', *Molecules*, 20(4), str. 5875–5888. doi: 10.3390/molecules20045875.

- Robert, P., García, P., Reyes, N., Chávez, J. i Santos, J. (2012) 'Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system', *Food Chemistry*, 134(1), str. 1–8. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.019.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliar, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. D. S. S. i Fett, R. (2011) 'Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L and *Vitis labrusca* L) widely produced in Brazil', *Food Chemistry*, 127(1), str. 174–179. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.137.
- Rodrigues, R. P., Sousa, A. M., Gando-Ferreira, L. M. i Quina, M. J. (2023) 'Grape pomace as a natural source of phenolic compounds: Solvent screening and extraction optimization', *Molecules*, 28(6), str. 2715. doi: 10.3390/molecules28062715.
- Rodríguez De Luna, S. L., Ramírez-Garza, R. E. i Serna Saldívar, S. O. (2020) 'Environmentally friendly methods for flavonoid extraction from plant material: Impact of their operating conditions on yield and antioxidant properties', *The Scientific World Journal*, 2020, str. 1–38. doi: 10.1155/2020/6792069.
- Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F. i Brosse, N. (2013) 'Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard', *Industrial Crops and Products*, 1(11), str. 2428–2438. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.053.
- Roy, A., Bajpai, J. i Bajpai, A. K. (2009) 'Development of calcium alginate –gelatin based microspheres for controlled release of endosulfan as a model pesticide', *Indian Journal of Chemical Technology*, 16(5), str. 388–395.
- Saarai, A., Kasparkova, V., Sedlacek, T. i Saha, P. (2013) 'On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 18, str. 152–166. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.11.010.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M. i Lobo, M. G. (2018) 'Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), str. 512–531. doi: 10.1111/1541-4337.12330.
- Samborska, K., Boostani, S., Geranpour, M., Hosseini, H., Dima, C., Khoshnoudi-Nia, S., Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S. i Jafari, S. M. (2021) 'Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals', *Trends in Food Science & Technology*, 108, str. 297–325. doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.008.
- Sang, Y., Wang, J., Zhang, Yongxiang, Gao, H., Ge, S., Feng, H., Zhang, Yan, Ren, F., Wen, P. i Wang, R. (2023) 'Influence of Temperature during freeze-drying process on the viability of *Bifidobacterium longum* BB68S', *Microorganisms*, 11(1), str. 181. doi: 10.3390/microorganisms11010181.
- Sant'Anna, V., Christiano, F. D. P., Marczak, L. D. F., Tessaro, I. C. i Thys, R. C. S. (2014) 'The effect of the incorporation of grape marc powder in fettuccini pasta properties',

- LWT - Food Science and Technology*, 58(2), str. 497–501. doi: 10.1016/j.lwt.2014.04.008.
- Santos, F. T., Goufo, P., Santos, C., Botelho, D., Fonseca, J., Queirós, A., Costa, M. S. S. M. i Trindade, H. (2016) 'Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media for lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C', *Food Chemistry*, 209, str. 293–301. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.087.
- Sathisaran, I. i Balasubramanian, M. (2020) 'Physical characterization of chitosan/gelatin-alginate composite beads for controlled release of urea', *Heliyon*, 6(11), str. e05495. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05495.
- Satyanarayana, K. G., Arizaga, G. G. C. i Wypych, F. (2009) 'Biodegradable composites based on lignocellulosic fibers—An overview', *Progress in Polymer Science*, 34(9), str. 982–1021. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.12.002.
- Saura-Calixto, F. (1998) 'Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), str. 4303–4306. doi: 10.1021/jf9803841.
- Saxena, M., Saxena, J. i Pradhan, A. (2012) 'Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(2), str. 130–134.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. i Pell, A. N. (2001) 'Analysis of condensed tannins: A review', *Animal Feed Science and Technology*, 91(1–2), str. 21–40. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00228-0.
- Schutyser, W., Renders, T., Van Den Bosch, S., Koelewijn, S.-F., Beckham, G. T. i Sels, B. F. (2018) 'Chemicals from lignin: An interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading', *Chemical Society Reviews*, 47(3), str. 852–908. doi: 10.1039/C7CS00566K.
- Sęczyk, Ł., Sugier, D., Świeca, M. i Gawlik-Dziki, U. (2021) 'The effect of *in vitro* digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds', *Food Chemistry*, 344, str. 128581. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128581.
- Seddiqi, H., Oliaei, E., Honarkar, H., Jin, J., Geonzon, L. C., Bacabac, R. G. i Klein-Nulend, J. (2021) 'Cellulose and its derivatives: Towards biomedical applications', *Cellulose*, 28(4), str. 1893–1931. doi: 10.1007/s10570-020-03674-w.
- Senuma, Y., Lowe, C., Zweifel, Y., Hilborn, J. G. i Marison, I. (2000) 'Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization', *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5), str. 616–622. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000305)67:5%3C616::AID-BIT12%3E3.0.CO;2-Z.
- Shafiee-Jood, M. i Cai, X. (2016) 'Reducing food loss and waste to enhance food security and environmental sustainability', *Environmental Science & Technology*, 50(16), str. 8432–8443. doi: 10.1021/acs.est.6b01993.

- Shahidi, F. i Dissanayaka, C. S. (2023) 'Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses – a review', *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), str. 2. doi: 10.1186/s43014-022-00121-0.
- Sharma, N., Tiwari, N., Vyas, M., Khurana, N., Muthuraman, A. i Utreja, P. (2020) 'An overview of therapeutic effects of vanillic acid', *Plant Archives*, 20(2), str. 3053–3059.
- Shen, D., Feng, Y., Zhang, X., Gong, L., Liu, J., Li, Y. i Liao, H. (2022) 'Antiosteoporosis Studies of 20 medicine food homology plants containing quercetin, rutin, and kaempferol: TCM characteristics, *in vivo* and *in vitro* activities, potential mechanisms, and food functions', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, str. 1–20. doi: 10.1155/2022/5902293.
- Shimadzu Corporation (2023) 'TOC in daily practice', *TOC Application Handbook - Shimadzu Scientific Instruments*. str. 1–36.
- Shimadzu Corporation (2020) 'Total organic carbon analysis Measurement of total nitrogen (TN) for protein estimation in pharmaceutical vaccines on the Shimadzu TOC-L with TNM-L', *Application News No. O76*, str. 1–2.
- Siddiqui, I. A., Adhami, V. M., Bharali, D. J., Hafeez, B. B., Asim, M., Khwaja, S. I., Ahmad, N., Cui, H., Mousa, S. A. i Mukhtar, H. (2009) 'Introducing nanochemoprevention as a novel approach for cancer control: Proof of principle with green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate', *Cancer Research*, 69(5), str. 1712–1716. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3978.
- Siepmann, J. i Peppas, N. A. (2011) 'Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse', *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), str. 6–12. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.051.
- Siepmann, J. i Peppas, N. A. (2012) 'Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, str. 163–174. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.028.
- Siepmann, J. i Siepmann, F. (2008) 'Mathematical modeling of drug delivery', *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), str. 328–343. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.004.
- Silva, A. S., Reboredo-Rodríguez, P., Süntar, I., Sureda, A., Belwal, T., Loizzo, M. R., Tundis, R., Sobarzo-Sanchez, E., Rastrelli, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Battino, M., Filosa, R., Daglia, M., Nabavi, S. F. i Nabavi, S. M. (2020) 'Evaluation of the *status quo* of polyphenols analysis: Part I—Phytochemistry, bioactivity, interactions, and industrial uses', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), str. 3191–3218. doi: 10.1111/1541-4337.12629.
- Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M. i Pintado, M. E. (2015) 'Anthocyanin extraction from plant tissues: A review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), str. 3072–3083. doi: 10.1080/10408398.2015.1087963.
- Simpson, D. i Amos, S. (2017) 'Other plant metabolites', u Badal McCreath, S. (ur.) *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. London, UK: Elsevier, str. 267–280. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00012-3.

- Siripatrawan, U. i Vitchayakitti, W. (2016) 'Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis', *Food Hydrocolloids*, 61, str. 695–702. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.001.
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V. K., Gnansounou, E. i Bharathiraja, B. (2020) 'Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery', *Bioresource Technology*, 314, str. 123771. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123771.
- Soares, S., Vitorino, R., Osório, H., Fernandes, A., Venâncio, A., Mateus, N., Amado, F. i De Freitas, V. (2011) 'Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), str. 5535–5547. doi: 10.1021/jf104975d.
- Song, J., He, Y., Luo, C., Feng, B., Ran, F., Xu, H., Ci, Z., Xu, R., Han, L. i Zhang, D. (2020) 'New progress in the pharmacology of protocatechuic acid: A compound ingested in daily foods and herbs frequently and heavily', *Pharmacological Research*, 161, str. 105109. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105109.
- Song, J., Yu, Y., Chen, M., Ren, Z., Chen, L., Fu, C., Ma, Z. F. i Li, Z. (2022) 'Advancement of protein- and polysaccharide-based biopolymers for anthocyanin encapsulation', *Frontiers in Nutrition*, 9, str. 938829. doi: 10.3389/fnut.2022.938829.
- Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M. D., Lima, A. D., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, A. L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. D. N. i Rodrigues, L. L. (2014) 'Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L), Benitaka variety, grown in the semiarid region of northeast Brazil', *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(1), str. 135–142. doi: 10.1590/S0101-20612014000100020.
- Stenmarck, Å., Jensen, C., Quested, T. i Moates, G. (2016) 'Estimates of European food waste levels', Stockholm: IVL Swedish Environmental Research Institute. doi: 10.13140/RG.2.1.4658.4721.
- Stoica, R., Pop, S. F. i Ion, R. M. (2013) 'Evaluation of natural polyphenols entrapped in calcium alginate beads prepared by the ionotropic gelation method', *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 15, str. 893–898.
- Stojanovic, R., Belcak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V. i Bugarski, B. (2012) 'Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L) aqueous extract in calcium alginate beads', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), str. 685–696. doi: 10.1002/jsfa.4632.
- Stratil, P., Klejdus, B. i Kubán, V. (2006) 'Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), str. 607–616. doi: 10.1021/jf052334j.

- Strelec, I. i Kovač, T. (2014) 'Praktikum iz biokemije'. Osijek, Republika Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z. i Zhang, H. (2015) 'Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, str. 1–9. doi: 10.1155/2015/595393.
- Sutherland, I. W. (1999) 'Polysaccharases for microbial exopolysaccharides', *Carbohydrate Polymers*, 38(4), str. 319–328. doi: 10.1016/S0144-8617(98)00114-3.
- Szente, L. i Fenyvesi, É. (2017) 'Cyclodextrin-lipid complexes: Cavity size matters', *Structural Chemistry*, 28(2), str. 479–492. doi: 10.1007/s11224-016-0884-9.
- Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Grgić, J., Perković, G., Koceva Komlenić, D. i Bucić-Kojić, A. (2022) 'A comparative study of the influence of various fungal-based pretreatments of grape pomace on phenolic compounds recovery', *Foods*, 11(11), str. 1665. doi: 10.3390/foods11111665.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M. i Knez, Ž. (2005) 'Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities', *Food Chemistry*, 89(2), str. 191–198. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.025.
- Tackenberg, M. W., Krauss, R., Schuchmann, H. P. i Kleinebudde, P. (2015) 'Encapsulation of orange terpenes investigating a plasticisation extrusion process', *Journal of Microencapsulation*, 32(4), str. 408–417. doi: 10.3109/02652048.2015.1035686.
- Taheri, A. i Jafari, S. M. (2019) 'Nanostructures of gums for encapsulation of food ingredients', u Jfari, S. M. (ur.) *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*. Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, str. 521–578. doi: 10.1016/B978-0-12-815663-6.00018-5.
- Takka, S. i Gürel, A. (2010) 'Evaluation of chitosan/alginate beads using experimental design: Formulation and *in vitro* characterization', *AAPS PharmSciTech*, 11(1), str. 460–466. doi: 10.1208/s12249-010-9406-z.
- Tao, Y., Wang, P., Wang, J., Wu, Y., Han, Y. i Zhou, J. (2017) 'Combining various wall materials for encapsulation of blueberry anthocyanin extracts: Optimization by artificial neural network and genetic algorithm and a comprehensive analysis of anthocyanin powder properties', *Powder Technology*, 311, str. 77–87. doi: 10.1016/j.powtec.2017.01.078.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A. i Zajac, N. (2013) 'Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods: A review', *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(2), str. 79–84.
- Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B. i Marostica Junior, M. R. (2020) 'Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation', *Food Research International*, 133, str. 109092. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109092.

- Taskin, O. (2020) 'Evaluation of freeze drying for whole, half cut and puree black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L)', *Heat and Mass Transfer*, 56(8), str. 2503–2513. doi: 10.1007/s00231-020-02867-0.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. i Garcia-Viguera, C. (2014) 'Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), str. 15638–15678. doi: 10.3390/ijms150915638.
- Thilakarathna, S. i Rupasinghe, H. (2013) 'Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement', *Nutrients*, 5(9), str. 3367–3387. doi: 10.3390/nu5093367.
- Tolun, A., Altintas, Z. i Artik, N. (2016) 'Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization', *Journal of Biotechnology*, 239, str. 23–33. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.10.001.
- Tolun, A., Artik, N. i Altintas, Z. (2020) 'Effect of different microencapsulating materials and relative humidities on storage stability of microencapsulated grape pomace extract', *Food Chemistry*, 302, str. 125347. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125347.
- Tonon, R. V., Brabet, C. i Hubinger, M. D. (2008) 'Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart) powder produced by spray drying', *Journal of Food Engineering*, 88(3), str. 411–418. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029.
- Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventos, R. M. i Moreno, J. J. (2018) 'Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research', *Biochemical Pharmacology*, 156, str. 186–195. doi: 10.1016/j.bcp.2018.07.050.
- Tsai, F.-H., Kitamura, Y. i Kokawa, M. (2017) 'Effect of gum arabic-modified alginate on physicochemical properties, release kinetics, and storage stability of liquid-core hydrogel beads', *Carbohydrate Polymers*, 174, str. 1069–1077. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.07.031.
- Tsali, A. i Goula, A. M. (2018) 'Valorization of grape pomace: Encapsulation and storage stability of its phenolic extract', *Powder Technology*, 340, str. 194–207. doi: 10.1016/j.powtec.2018.09.011.
- Tsao, R. (2010) 'Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols', *Nutrients*, 2(12), str. 1231–1246. doi: 10.3390/nu2121231.
- Tseng, A. i Zhao, Y. (2013) '„Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing', *Food Chemistry*, 138(1), str. 356–365. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.148.
- Tyufin, A. A. i Kerry, J. P. (2021) 'Gelatin films: Study review of barrier properties and implications for future studies employing biopolymer films', *Food Packaging and Shelf Life*, 29, str. 100688. doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100688.

- Uhljar, L. É., Kan, S. Y., Radacsi, N., Koutsos, V., Szabó-Révész, P. i Ambrus, R. (2021) 'In vitro drug release, permeability, and structural test of ciprofloxacin-loaded nanofibers', *Pharmaceutics*, 13(4), str. 556. doi: 10.3390/pharmaceutics13040556.
- Unagolla, J. M. i Jayasuriya, A. C. (2018) 'Drug transport mechanisms and *in vitro* release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, str. 199–209. doi: 10.1016/j.ejps.2017.12.012.
- United Nations (2024) 'World population prospects 2024: Summary of results', *UN DESA/POP/2024/TR/NO. 9*.
- Upadhayay, S. i Alqassimi, O. (2018) 'Transition from linear to circular economy', *Westcliff International Journal of Applied Research*, 2(2), str. 62–74. doi: 10.47670/wuwijar201822OASU.
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P. i Robert, P. (2014) 'Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage', *Food Chemistry*, 157, str. 246–251. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.037.
- Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B. C., Liyanage, R. i Sivakanesan, R. (2020) 'Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), str. 2836–2847. doi: 10.1002/jsfa.10315.
- Wang, A. i Wang, W. (2013) 'Gum-g-copolymers: Synthesis, properties, and applications', u Kalia, S. i Sabaa, M. W. (ur.) *Polysaccharide Based Graft Copolymers*. Berlin, Njemačka: Springer Berlin Heidelberg, str. 149–203. doi: 10.1007/978-3-642-36566-9_5.
- Wang, L., Yang, S., Cao, J., Zhao, S. i Wang, W. (2016) 'Microencapsulation of ginger volatile oil based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 64(1), str. 21–26. doi: 10.1248/cpb.c15-00571.
- Wang, Z., Li, S., Ge, S. i Lin, S. (2020) 'Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), str. 3330–3343. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06574.
- Watanabe, H., Matsuyama, T. i Yamamoto, H. (2003) 'Experimental study on electrostatic atomization of highly viscous liquids', *Journal of Electrostatics*, 57(2), str. 183–197. doi: 10.1016/S0304-3886(02)00139-0.
- Waterhouse, A. L. (2001) 'Determination of total phenolics', u *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York, SAD: John Wiley & Sons Inc., str. I1.1.1–I1.1.8.
- Wei, X., Chen, D., Yi, Y., Qi, H., Gao, X., Fang, H., Gu, Q., Wang, L. i Gu, L. (2012) 'Syringic acid extracted from *Herba dendrobii* prevents diabetic cataract pathogenesis by inhibiting aldose reductase activity', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, str. 1–13. doi: 10.1155/2012/426537.

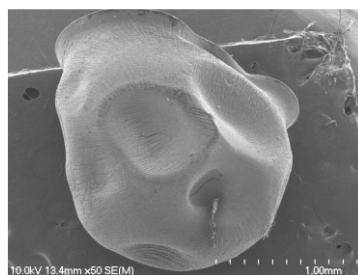
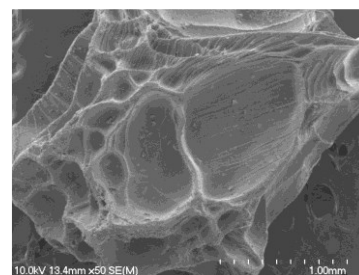
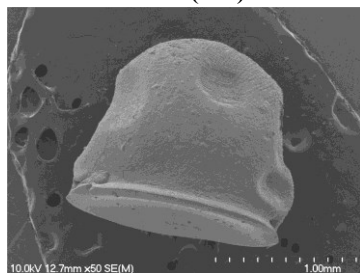
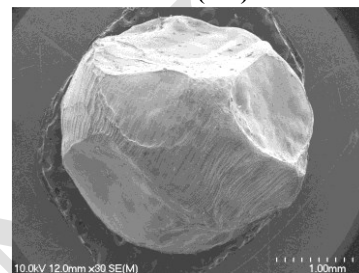
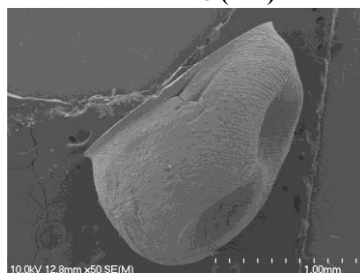
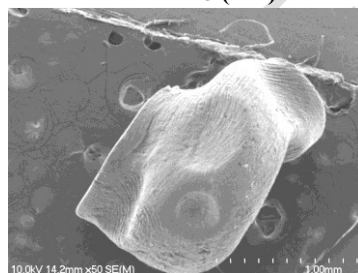
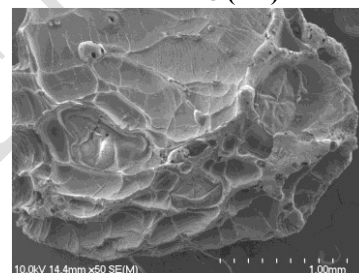
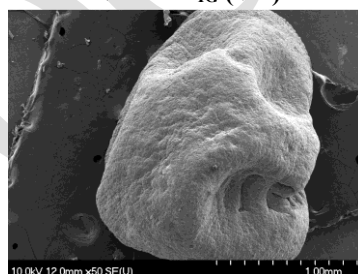
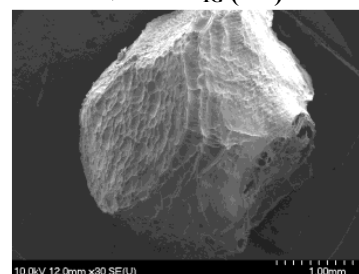
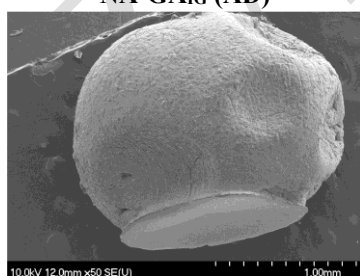
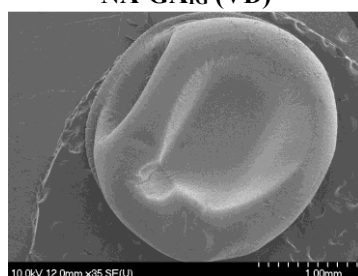
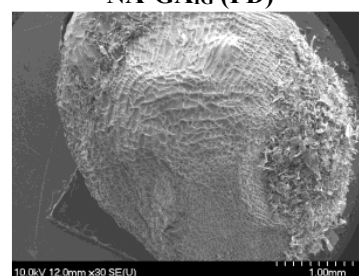
- Weiping, W. i Branwell, A. (2000) 'Tragacanth, Karaya', u Phillips, G. O. i Williams, P. A. (ur.) *Handbook of Hydrocolloids*. Sawston, UK: Woodhead publishing, str. 231–246.
- Weiskirchen, S. i Weiskirchen, R. (2016) 'Resveratrol: How much wine do you have to drink to stay healthy?', *Advances in Nutrition*, 7(4), str. 706–718. doi: 10.3945/an.115.011627.
- Werpy, T. i Petersen, G. (2004) *Top value added chemicals from biomass: Volume I - Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. Golden, SAD: National Renewable Energy Laboratory (NREL). doi: 10.2172/15008859.
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D. i Matwijczuk, A. (2020) 'Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—A non-systematic review', *Nutrients*, 12(5), str. 1401. doi: 10.3390/nu12051401.
- Wu, I. Y., Bala, S., Škalko-Basnet, N. i di Cagno, M. P. (2019) 'Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, str. 105026. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105026.
- Xing, N., Li, Y. K., Li, M. S. i Tian, F. (2012) 'Insight into effects of different drying methods on morphological properties of sodium alginate-chitosan double coacervation hydrogel beads', *Applied Mechanics and Materials*, 184–185, str. 1025–1029. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.184-185.1025.
- Xu, Y., Burton, S., Kim, C. i Sismour, E. (2016) 'Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties', *Food Science & Nutrition*, 4(1), str. 125–133. doi: 10.1002/fsn3.264.
- Xu, Z., Du, P., Meiser, P. i Jacob, C. (2012) 'Proanthocyanidins: Oligomeric structures with unique biochemical properties and great therapeutic promise', *Natural Product Communications*, 7(3), str. 1934578X1200700. doi: 10.1177/1934578X1200700321.
- Yamashita, C., Chung, M. M. S., Dos Santos, C., Mayer, C. R. M., Moraes, I. C. F. i Branco, I. G. (2017) 'Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp) by-product extract by freeze-drying', *LWT - Food Science and Technology*, 84, str. 256–262. doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.063.
- Yang, K., Zhang, L., Liao, P., Xiao, Z., Zhang, F., Sindaye, D., Xin, Z., Tan, C., Deng, J., Yin, Y. i Deng, B. (2020) 'Impact of gallic acid on gut health: Focus on the gut microbiome, immune response, and mechanisms of action', *Frontiers in Immunology*, 11, str. 580208. doi: 10.3389/fimmu.2020.580208.
- Yeo, Y., Baek, N. i Park, K. (2001) 'Microencapsulation methods for delivery of protein drugs', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(4), str. 213–230. doi: 10.1007/BF02931982.
- Yousefi, M., Khanniri, E., Shadnough, M., Khorshidian, N. i Mortazavian, A. M. (2020) 'Development, characterization and *in vitro* antioxidant activity of chitosan-coated

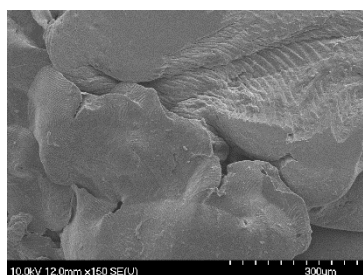
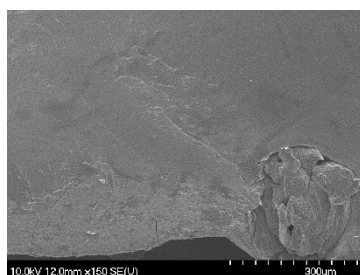
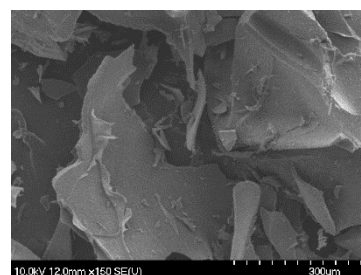
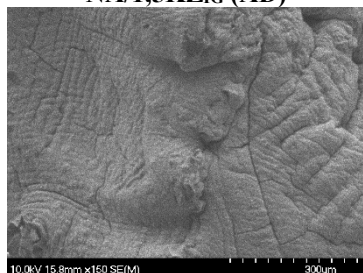
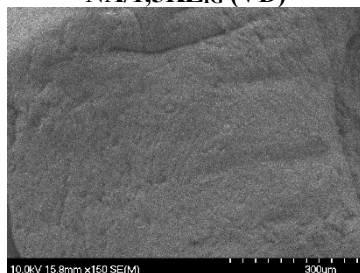
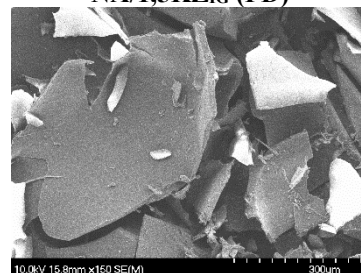
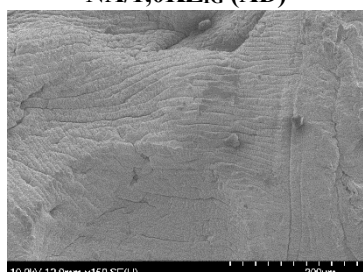
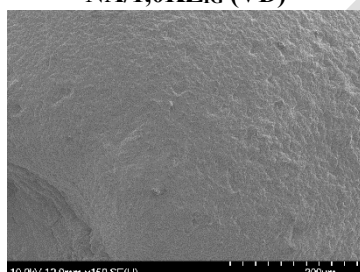
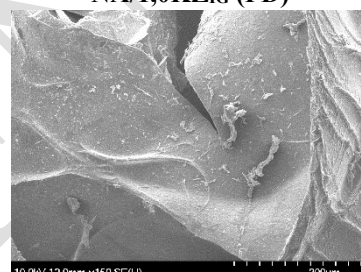
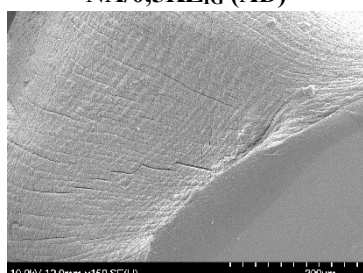
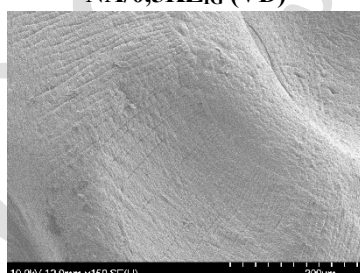
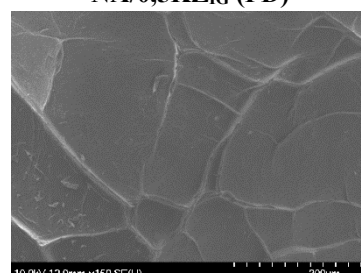
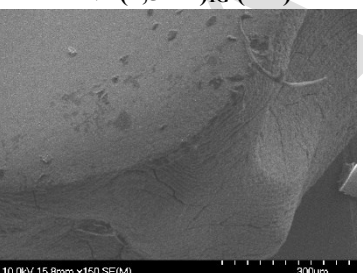
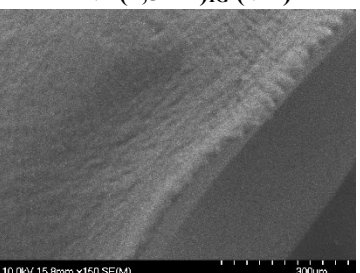
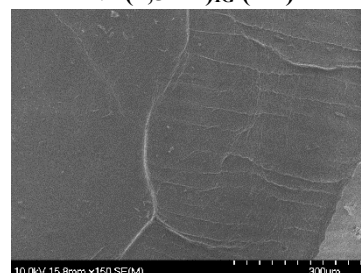
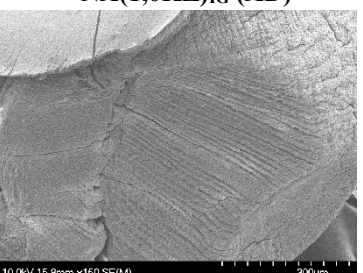
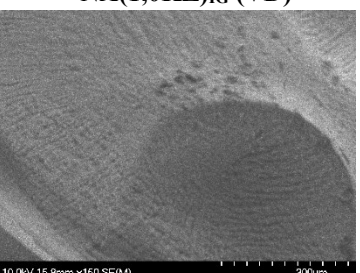
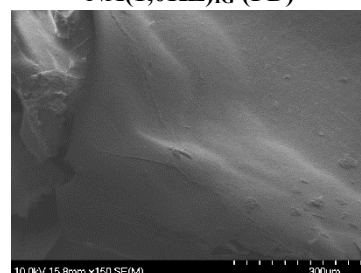
- alginate microcapsules entrapping *Viola odorata* Linn extract', *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, str. 44–54. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.250.
- Yun, P., Devahastin, S. i Chiewchan, N. (2021) 'Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive constituents: A review', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), str. 1768–1799. doi: 10.1111/1541-4337.12701.
- Yunhai, L., Jianguo, F., Ting, L., Wenqing, W. i Aihua, L. (2003) 'Anti-endotoxic effects of syringic acid of *Radix Isatidis*', *Current Medical Science*, 23(2), str. 206–208. doi: 10.1007/BF02859960.
- Zadeh, E. M., O'Keefe, S. F. i Kim, Y.-T. (2018) 'Utilization of lignin in biopolymeric packaging films', *ACS Omega*, 3(7), str. 7388–7398. doi: 10.1021/acsomega.7b01341.
- Zhang, F. J., Cheng, G. X., Gao, Z. i Li, C. P. (2006) 'Preparation of porous calcium alginate membranes/microspheres via an emulsion templating method', *Macromolecular Materials and Engineering*, 291(5), str. 485–492. doi: 10.1002/mame.200500405.
- Zhang, Y., Hu, X., Liu, X., Dandan, Y., Di, D., Yin, T., Zhang, S. i Tang, X. (2015) 'Dry state microcrystals stabilized by an HPMC film to improve the bioavailability of andrographolide', *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1–2), str. 214–223. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.057.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. i Xie, S. (2010) 'DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles', *The AAPS Journal*, 12(3), str. 263–271. doi: 10.1208/s12248-010-9185-1.
- Zhao, Y., Carvajal, M. T., Won, Y.-Y. i Harris, M. T. (2007) 'Preparation of calcium alginate microgel beads in an electrodispersion reactor using an internal source of calcium carbonate nanoparticles', *Langmuir*, 23(25), str. 12489–12496. doi: 10.1021/la701795y.
- Zhao, Y., Sun, H., Yang, B. i Weng, Y. (2020) 'Hemicellulose-based film: Potential green films for food packaging', *Polymers*, 12(8), str. 1775. doi: 10.3390/polym12081775.
- Zhu, F., Du, B., Zheng, L. i Li, J. (2015) 'Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace', *Food Chemistry*, 186, str. 207–212. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.057.
- Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. i Keen, C. L. (2002) 'Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), str. 1700–1705. doi: 10.1021/jf011228o.
- Zuidam, N. J. i Shimoni, E. (2002) 'Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them' u Zuidam, N. J. i Nedović, V. A. (ur.) *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, str. 3–29.

ZA OCJENU

7. PRILOZI

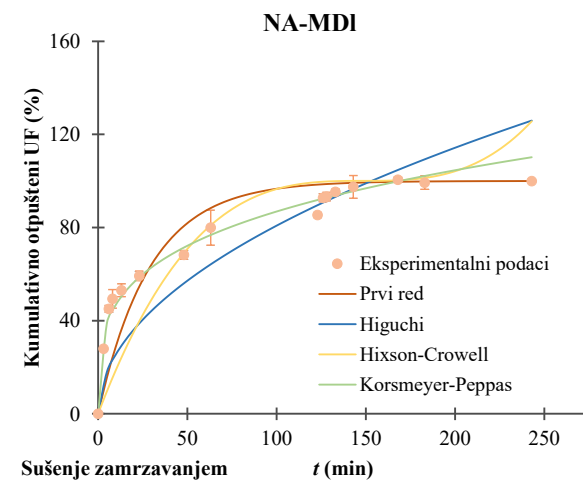
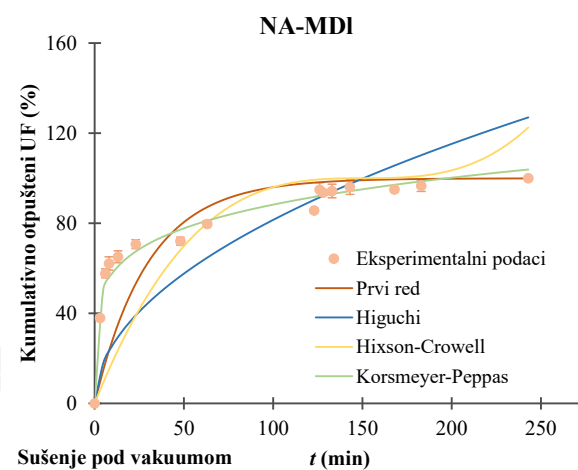
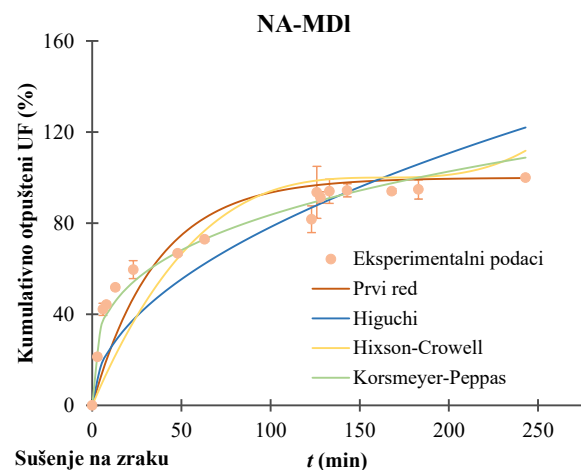
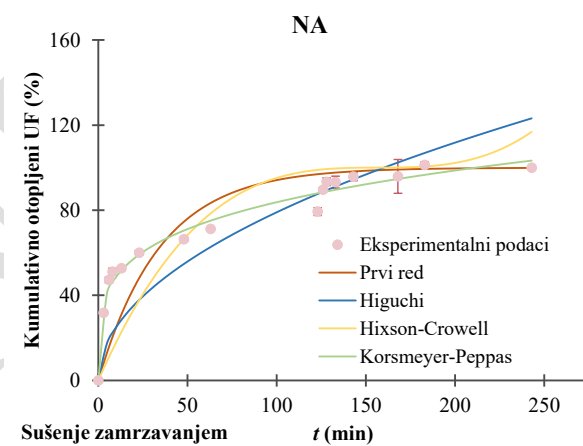
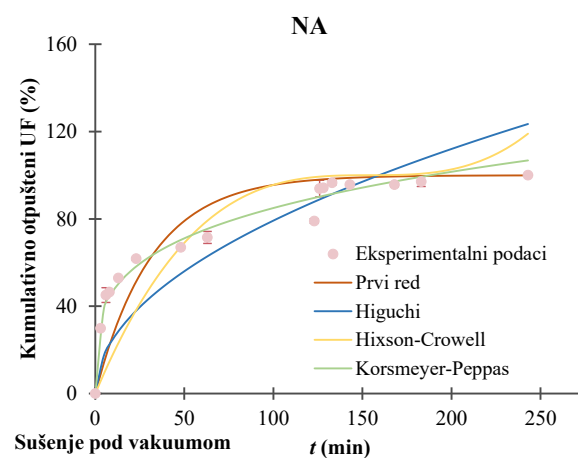
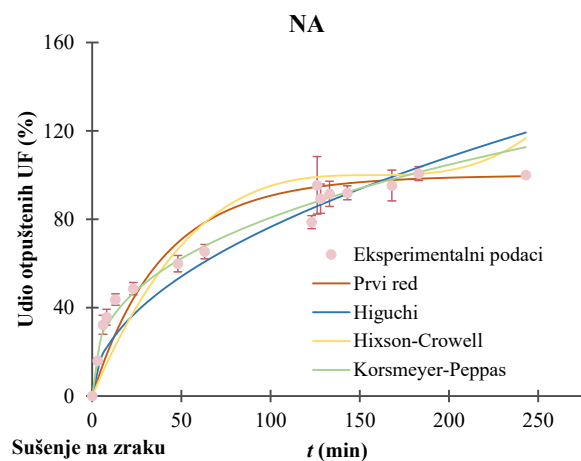
7.1. Prilog 1. Inkapsulacija ionskim geliranjem

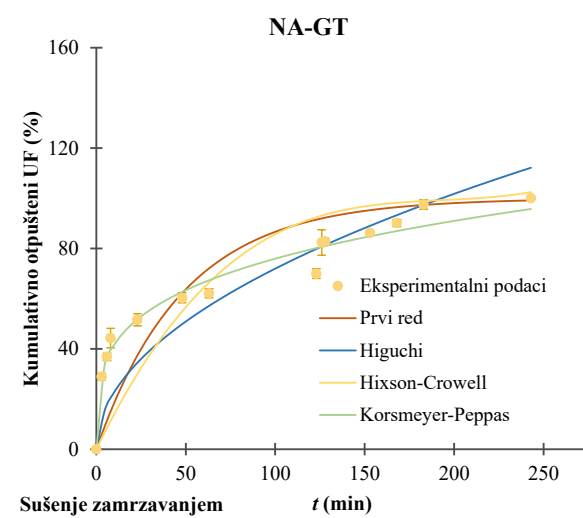
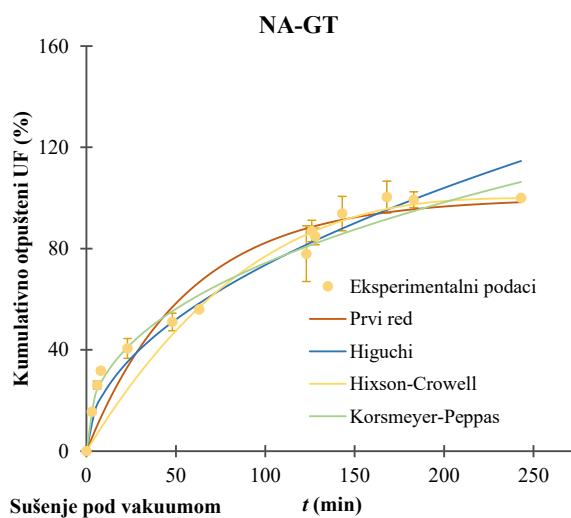
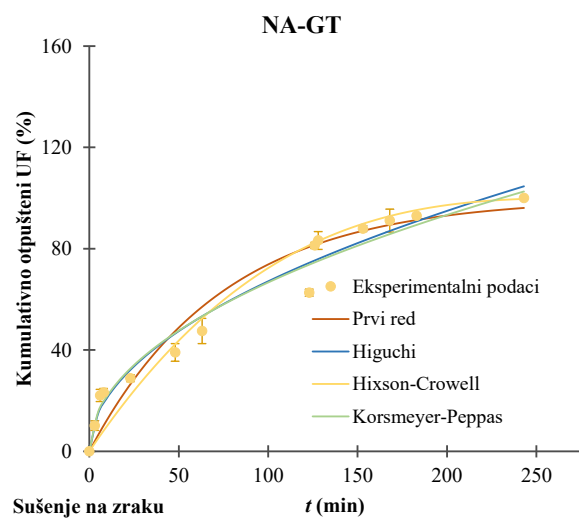
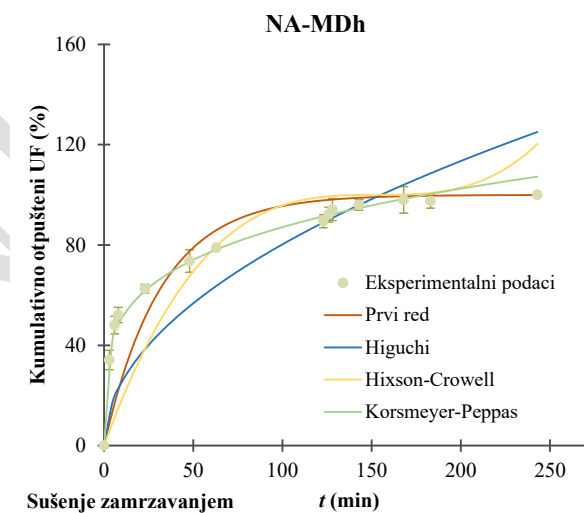
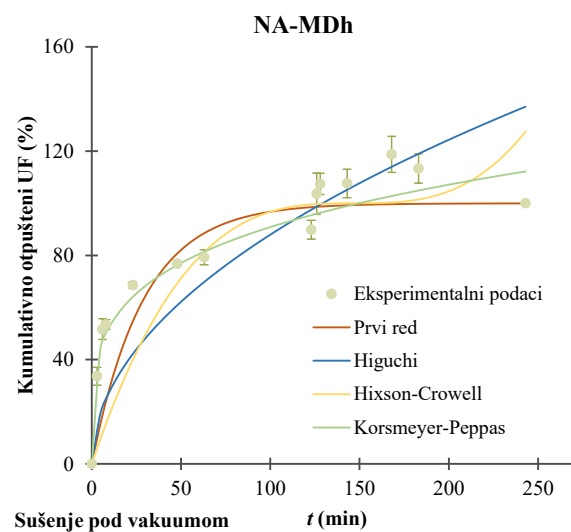
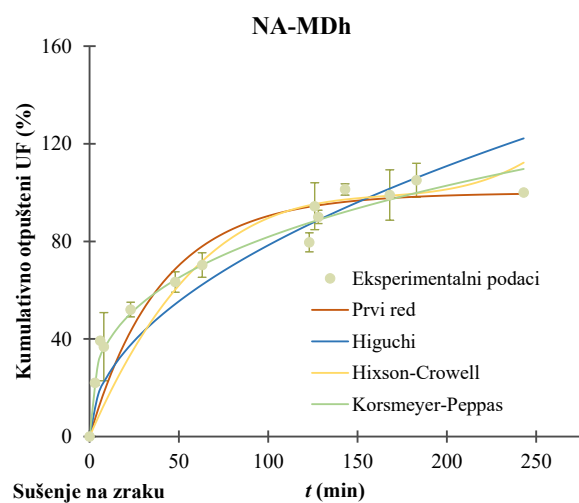
NA_{IG} (AD)NA_{IG} (VD)NA_{IG} (FD)NA-MD_{IG} (AD)NA-MD_{IG} (VD)NA-MD_{IG} (FD)NA-MDh_{IG} (AD)NA-MDh_{IG} (VD)NA-MDh_{IG} (FD)NA-GA_{IG} (AD)NA-GA_{IG} (VD)NA-GA_{IG} (FD)NA-ŽE_{IG} (AD)NA-ŽE_{IG} (VD)NA-ŽE_{IG} (FD)

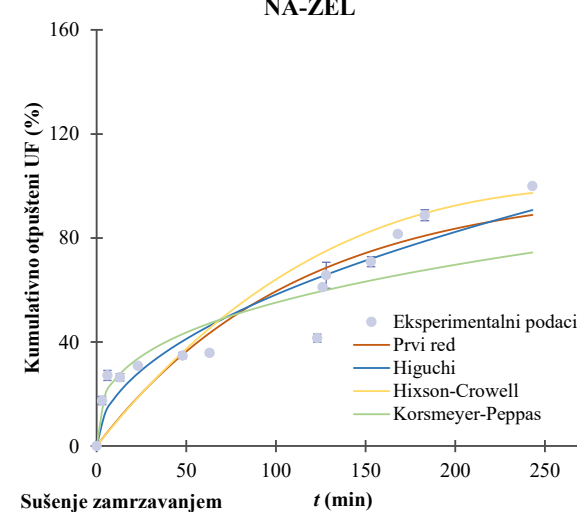
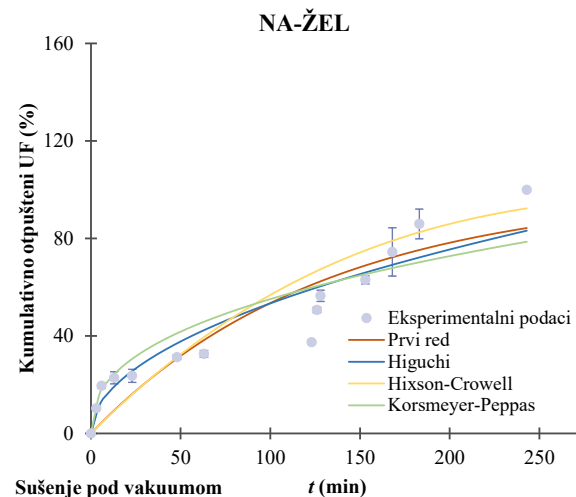
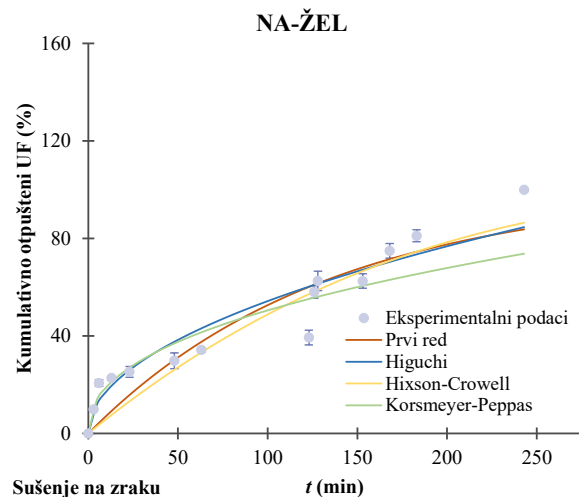
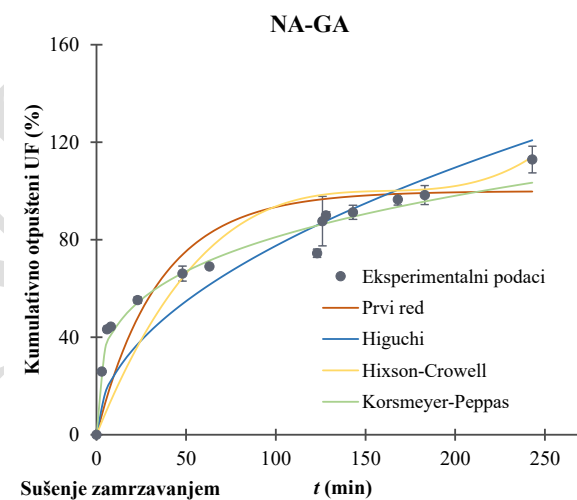
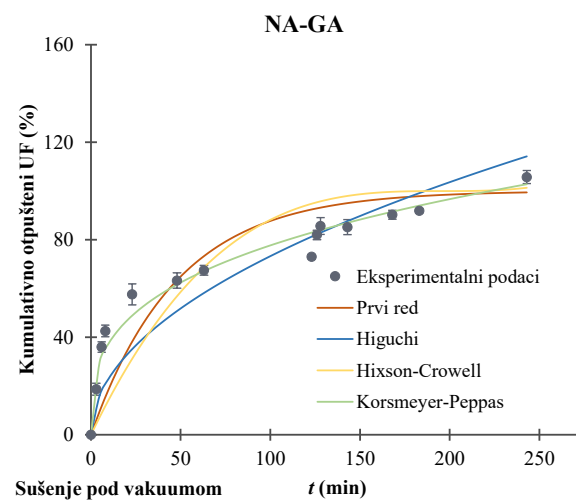
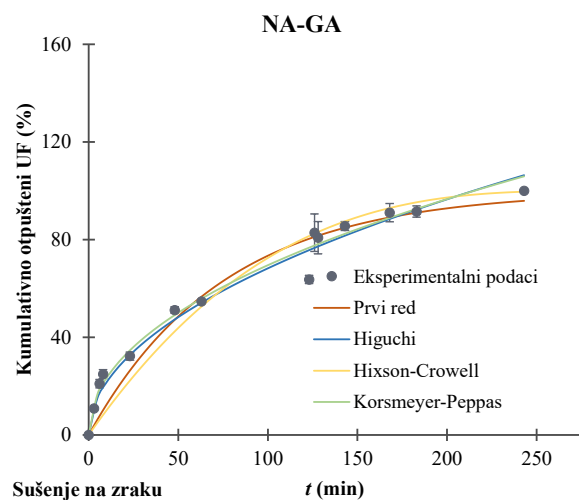
**NA/1,5KZ_{IG} (AD)****NA/1,5KZ_{IG} (VD)****NA/1,5KZ_{IG} (FD)****NA/1,0KZ_{IG} (AD)****NA/1,0KZ_{IG} (VD)****NA/1,0KZ_{IG} (FD)****NA/0,5KZ_{IG} (AD)****NA/0,5KZ_{IG} (VD)****NA/0,5KZ_{IG} (FD)****NA(1,5KZ)_{IG} (AD)****NA(1,5KZ)_{IG} (VD)****NA(1,5KZ)_{IG} (FD)****NA(1,0KZ)_{IG} (AD)****NA(1,0KZ)_{IG} (VD)****NA(1,0KZ)_{IG} (FD)****NA(0,5KZ)_{IG} (AD)****NA(0,5KZ)_{IG} (VD)****NA(0,5KZ)_{IG} (FD)**

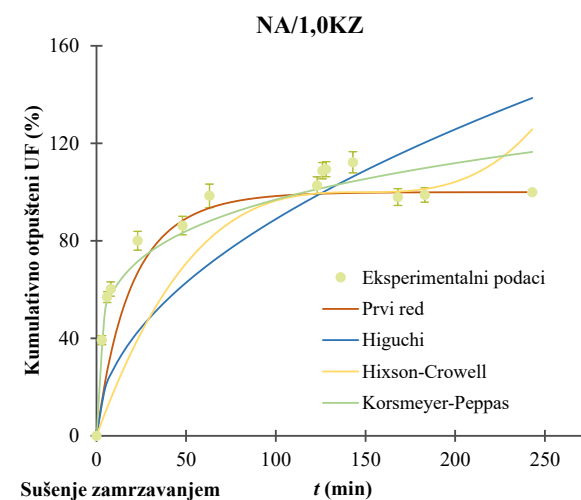
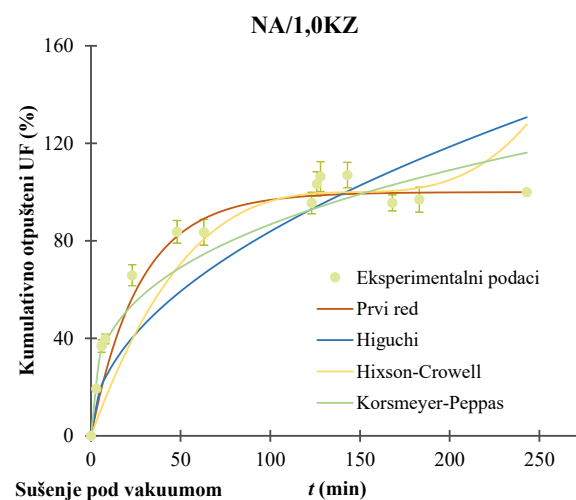
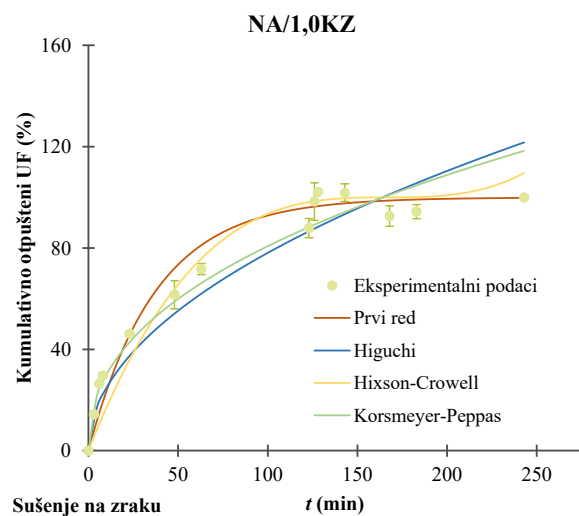
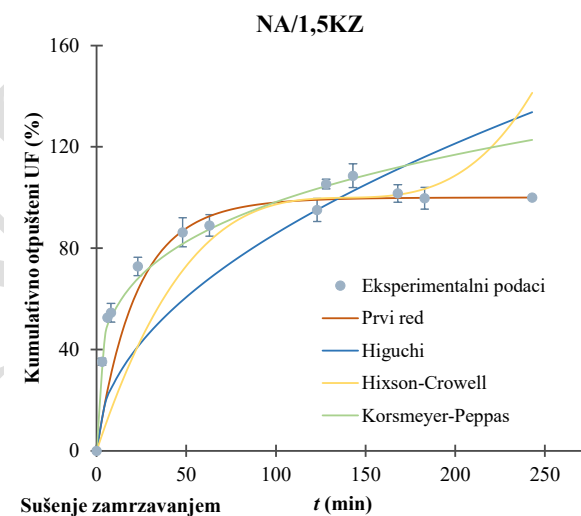
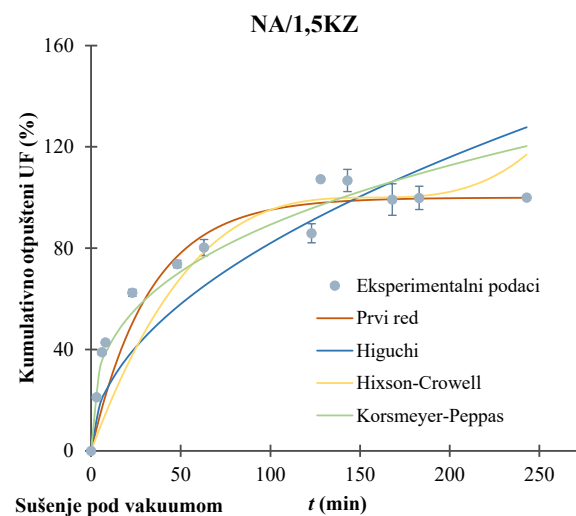
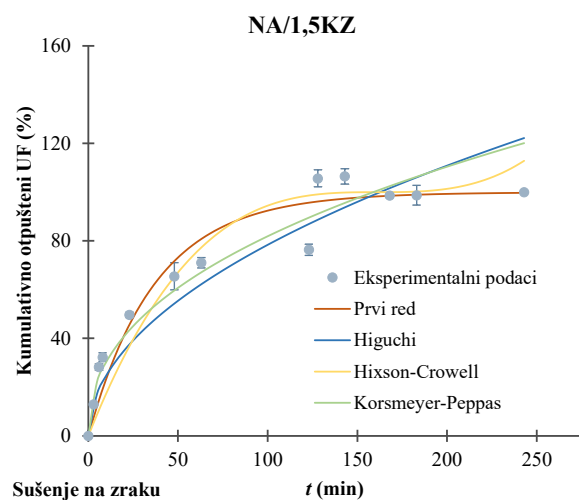
Slika P1.1 SEM slike CS inkapsulata dobivenih ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG} , $\text{NA-MDl}_{\text{IG}}$, $\text{NA-MDh}_{\text{IG}}$, NA-GT_{IG} , NA-GA_{IG} , $\text{NA-ŽEL}_{\text{IG}}$, $\text{NA/1,5KZ}_{\text{IG}}$, $\text{NA/1,0KZ}_{\text{IG}}$, $\text{NA/0,5KZ}_{\text{IG}}$, $\text{NA(1,5KZ)}_{\text{IG}}$, $\text{NA(1,0KZ)}_{\text{IG}}$, $\text{NA(0,5KZ)}_{\text{IG}}$ i sušenjem hidrogelova na zraku (**AD**), pod vakuumom (**VD**) i zamrzavanjem (**FD**)

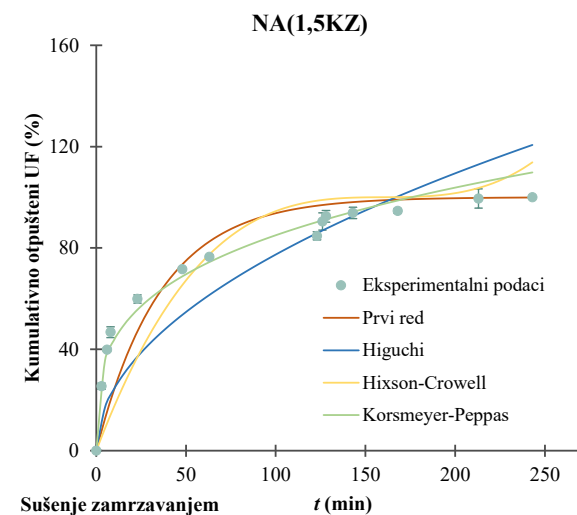
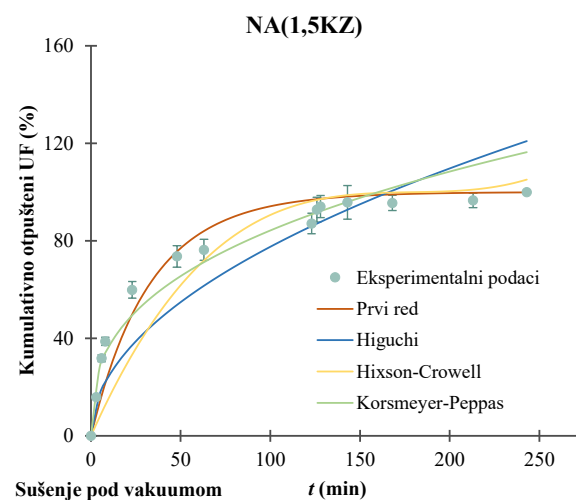
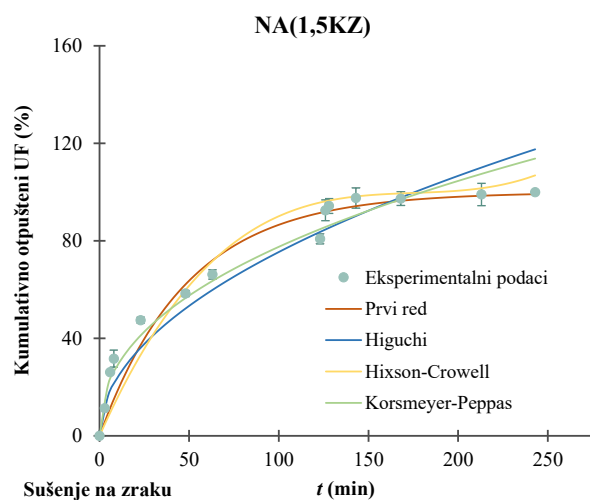
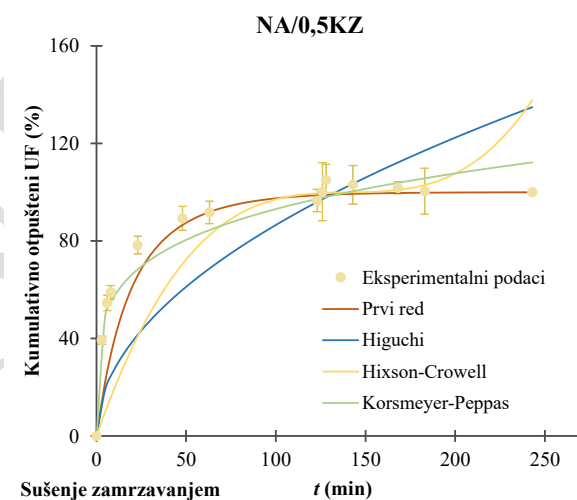
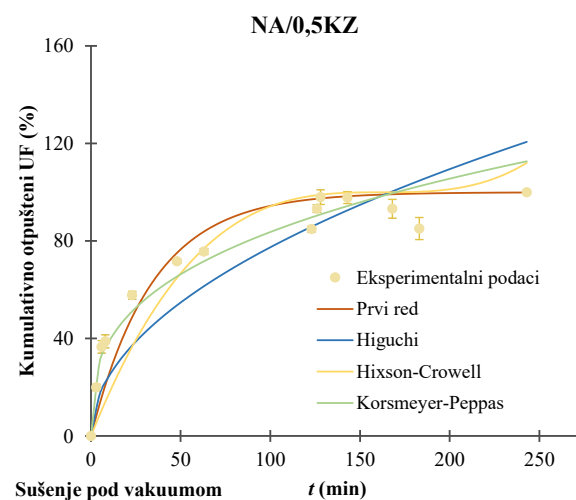
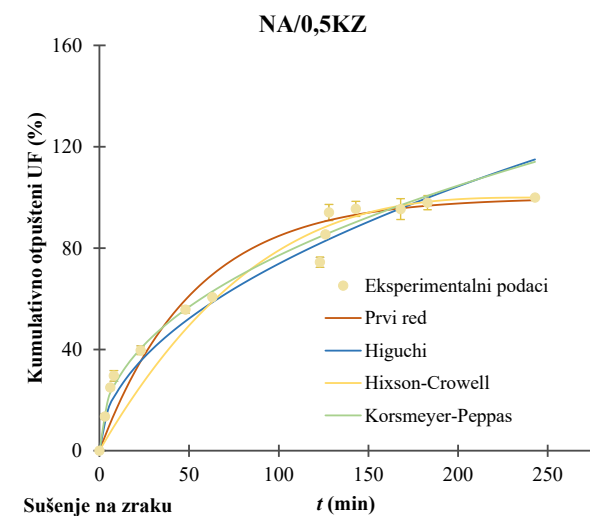
ZA OCJENU

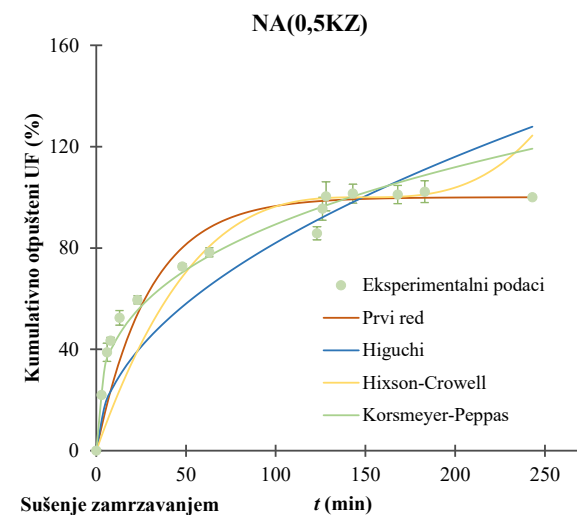
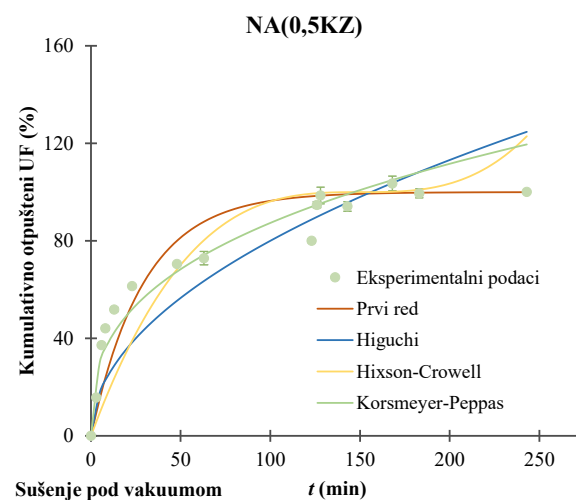
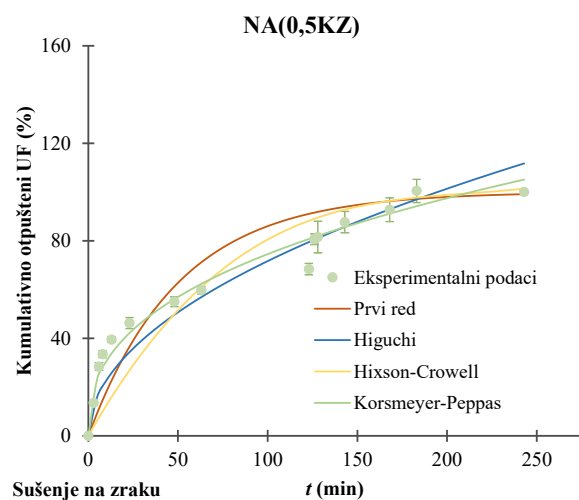
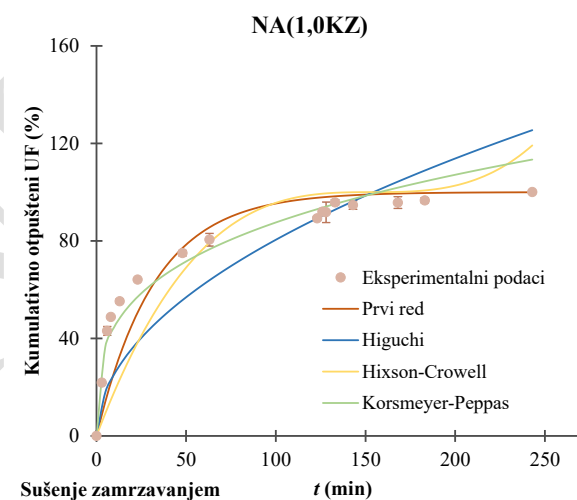
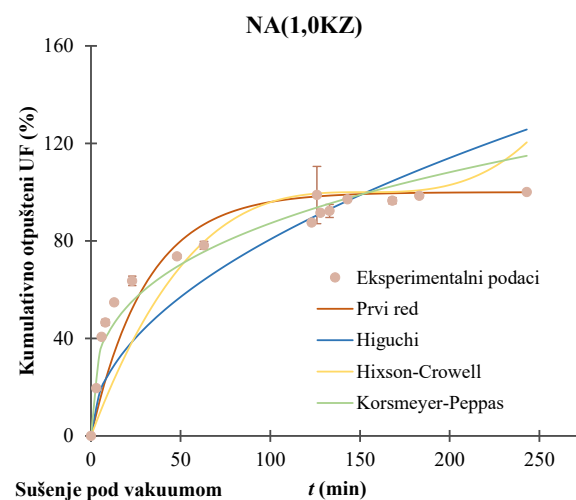
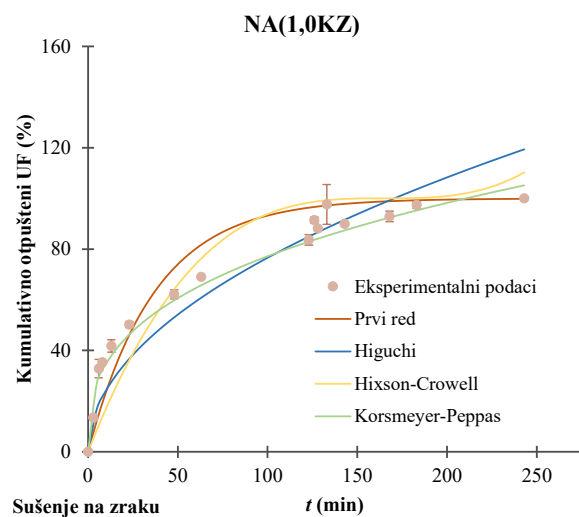




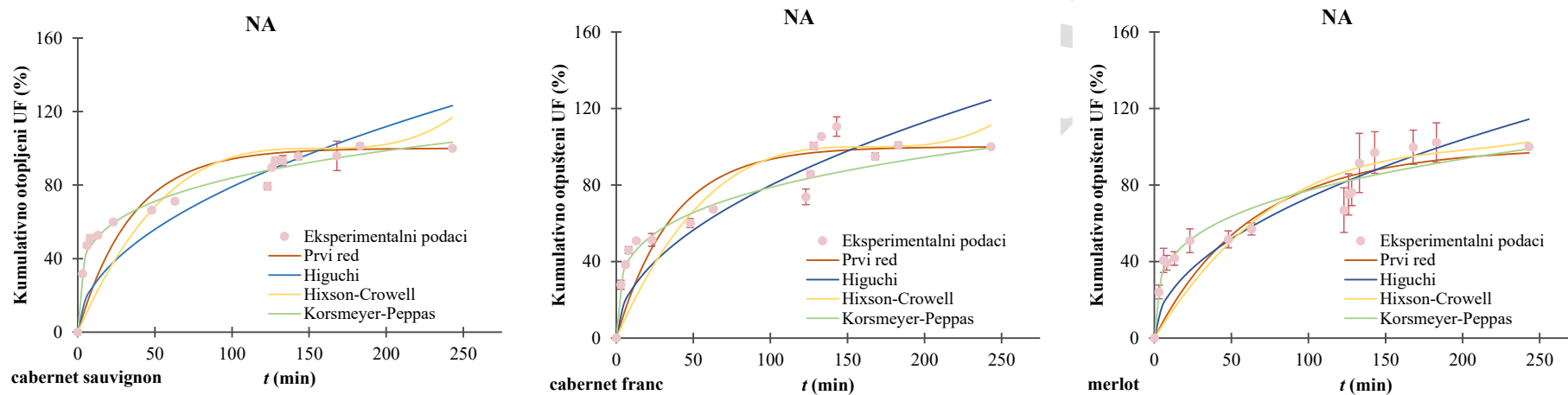


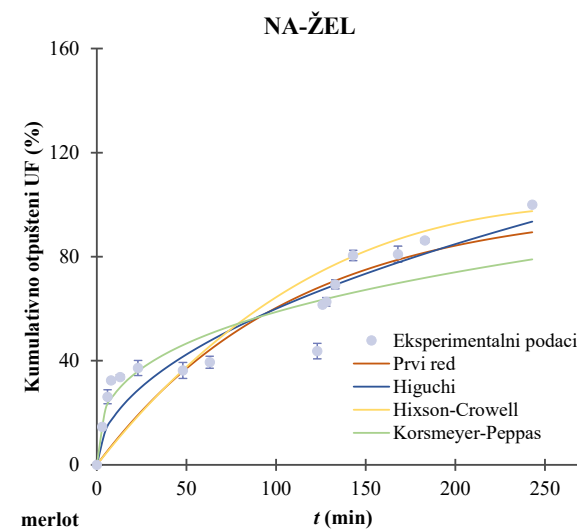
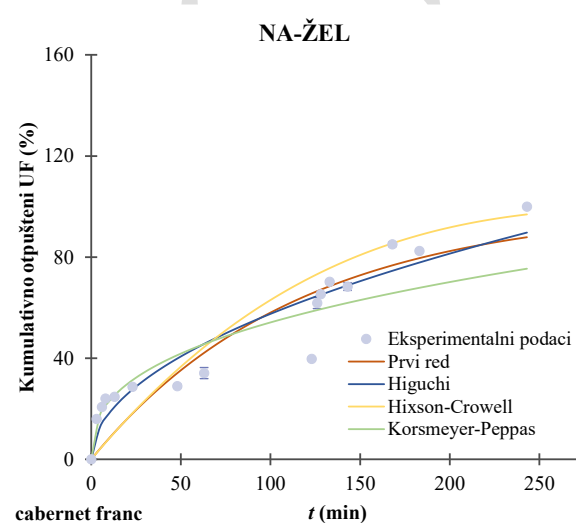
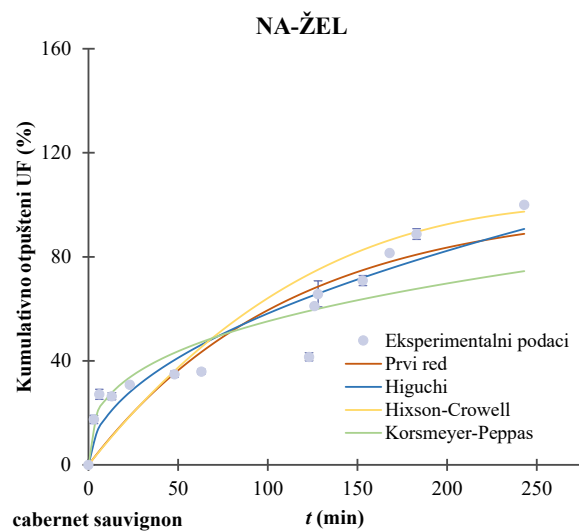
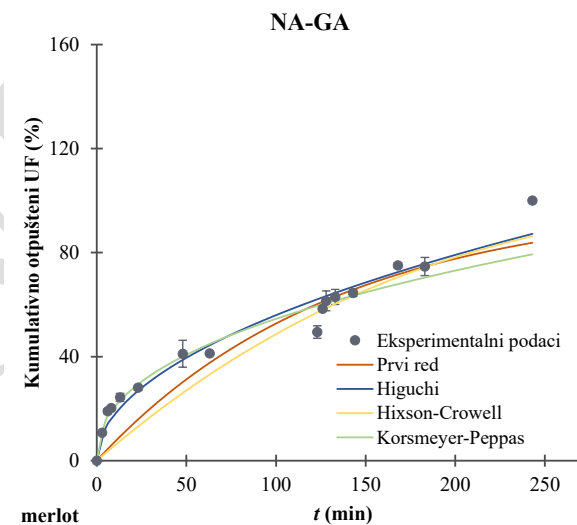
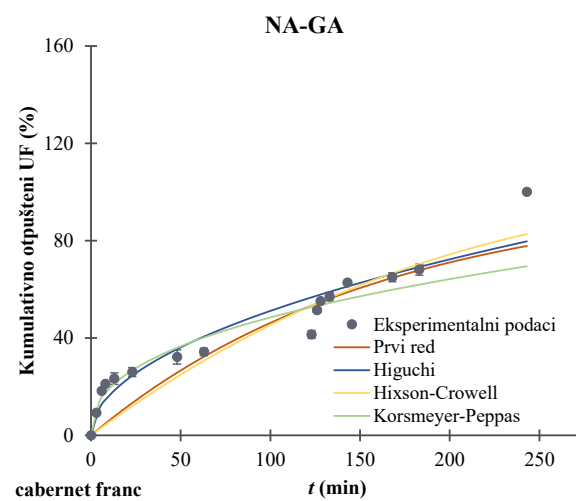
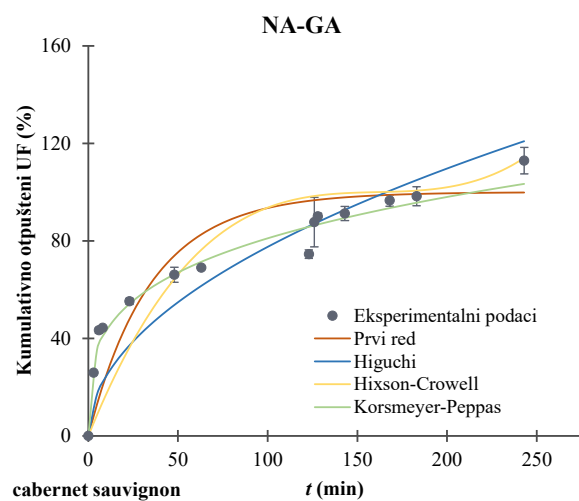


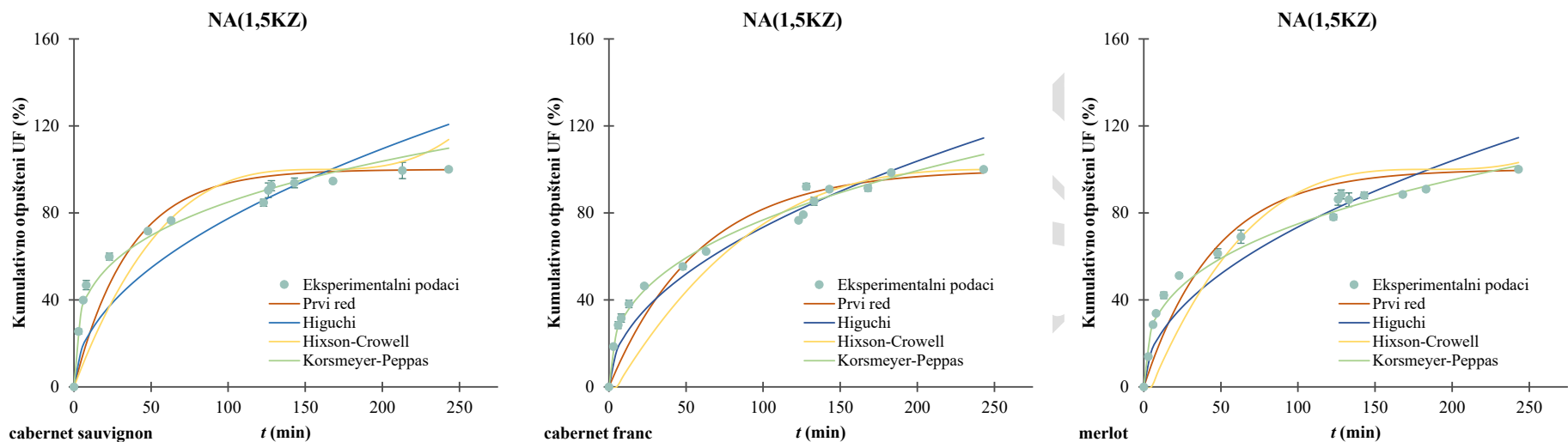




Slika P1.2 Kinetika otpuštanja UF-a iz CS inkapsulata pripremljenih pomoću inkapsulacije **ionskim geliranjem** primjenom različitih omotača (NA_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-MD_{IG}, NA-GT_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA/1,5KZ_{IG}, NA/1,0KZ_{IG}, NA/1,5KZ_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}, NA(1,0KZ)_{IG} i NA(0,5KZ)_{IG}) i **tri metode sušenja hidrogelova** (sušenje na zraku, vakuum sušenje i sušenje zamrzavanjem) (simboli - eksperimentalni podaci, linije - aproksimativne krivulje prema različitim matematičkim modelima)







Slika P1.3 Kinetika otpuštanja UF-a iz CS, CF i M inkapsulata pripremljenih pomoću ionskog geliranja primjenom različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) i sušenjem hidrogelova zamrzavanjem (simboli - eksperimentalni podaci, linije - aproksimativne krivulje prema različitim matematičkim modelima)

Tablica P1.1 Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranog ekstrakta tropa grožđa cabernet sauvignon (CS-NIE) te inkapsuliranog CS ekstrakta ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Fenolne kiseline (µg/100 mg _E)						
Galna kiselina	CS-NIE	0,70 ± 0,04	-	1,25 ± 0,01	-	36,26 ± 1,29
	NA _{IG}	1,37 ± 0,03	13,26 ± 0,20	12,86 ± 0,27	390,38 ± 6,50	229,99 ± 12,26
	NA-GA _{IG}	2,10 ± 0,05	32,00 ± 0,58	36,01 ± 1,25	269,02 ± 10,10	196,65 ± 6,16
	NA-ŽEL _{IG}	2,96 ± 0,07	29,18 ± 0,44	28,30 ± 0,59	889,42 ± 46,79	502,89 ± 26,80
	NA(1,5KZ) _{IG}	1,39 ± 0,10	25,31 ± 0,85	26,92 ± 1,15	375,70 ± 2,99	134,72 ± 1,65
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	11,36 ± 0,37
	NA _{IG}	nd	nd	nd	51,00 ± 9,94	26,48 ± 7,46
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	79,46 ± 0,73	67,96 ± 0,94
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	110,87 ± 21,62	69,91 ± 32,66
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	52,96 ± 0,20	52,50 ± 2,18

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Vanilinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	2,39 ± 0,11
	NA _{IG}	nd	nd	nd	3,80 ± 0,07	4,10 ± 0,20
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	8,32 ± 0,31	8,19 ± 0,31
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	7,70 ± 0,29	9,68 ± 1,46
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	4,20 ± 0,00
Siringinska kiselina	CS-NIE	9,94 ± 0,04	-	3,10 ± 0,06	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	2,68 ± 0,07	nd	nd	nd	nd
Elaginska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	1,63 ± 0,11
	NA _{IG}	1,39 ± 0,00	1,16 ± 0,03	2,86 ± 0,10	6,19 ± 0,53	5,61 ± 0,47
	NA-GA _{IG}	nd	1,52 ± 0,16	2,55 ± 0,16	11,05 ± 0,21	9,59 ± 0,42
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	3,28 ± 0,22	18,41 ± 0,74	8,55 ± 3,06
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	1,49 ± 0,07	4,37 ± 0,39	9,21 ± 0,53	6,81 ± 0,13
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	5,87 ± 0,93
	NA _{IG}	nd	2,31 ± 0,07	3,00 ± 0,84	24,80 ± 0,46	44,85 ± 3,33
	NA-GA _{IG}	nd	2,89 ± 0,21	4,17 ± 0,26	36,75 ± 0,52	54,90 ± 0,63
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	3,80 ± 0,81	68,98 ± 0,15	107,75 ± 8,74
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	3,67 ± 0,00	8,47 ± 0,39	32,05 ± 0,00	36,87 ± 0,00
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	CS-NIE	0,59 ± 0,14	-	0,21 ± 0,07	-	2,99 ± 0,11
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Kafeinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Ferulinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mg_E)						
Epikatehin	CS-NIE	79,11 ± 1,67	-	34,62 ± 0,71	-	50,19 ± 1,13
	NA _{IG}	nd	nd	nd	415,84 ± 2,32	404,81 ± 13,92
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	713,75 ± 12,71	701,59 ± 1,25
	NA-ŽEL _{IG}	11,26 ± 0,54	nd	24,34 ± 0,74	806,50 ± 8,83	754,84 ± 36,13
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	420,67 ± 1,73	460,26 ± 7,99
Katehin	CS-NIEs	61,78 ± 1,82	-	12,14 ± 0,57	-	nd
	NA _{IG}	4,75 ± 1,17	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	17,71 ± 3,10	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Epikatehin galat	CS-NIE	nd	-	6,99 ± 0,16	-	6,75 ± 0,76
	NA _{IG}	nd	14,16 ± 0,27	20,76 ± 1,54	36,80 ± 0,46	40,37 ± 0,33
	NA-GA _{IG}	nd	20,99 ± 0,42	32,17 ± 0,52	62,74 ± 3,54	83,23 ± 1,25
	NA-ŽEL _{IG}	nd	13,60 ± 0,15	21,74 ± 1,32	75,84 ± 2,50	120,21 ± 0,73
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	23,66 ± 0,43	70,72 ± 4,67	43,37 ± 1,26	46,67 ± 3,56
Galokatehin galat	CS-NIE	nd	-	nd	-	182,35 ± 7,51
	NA _{IG}	nd	nd	nd	453,34 ± 5,10	502,23 ± 2,33
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	762,57 ± 3,02	858,62 ± 14,40
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	975,15 ± 21,04	1165,12 ± 40,64
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	491,67 ± 0,20	559,89 ± 3,83
Procijanidin B1	CS-NIE	21,28 ± 1,36	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Procijanidin B2	CS-NIE	22,85 ± 0,34	-	8,81 ± 0,07	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavonoli (µg/100 mg_E)						
Kvercetin	CS-NIE	17,75 ± 0,06	-	1,60 ± 0,08	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	CS-NIE	4,95 ± 0,13	-	2,53 ± 0,07	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Stilbeni (µg/100 mg_E)						
Resveratrol	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
ε-Viniferin	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Antocijani (µg/100 mg_E)						
Oenin klorid	CS-NIE	47,12 ± 0,25	-	64,71 ± 0,01	-	31,42 ± 2,56
	NA _{IG}	3,41 ± 0,22	4,60 ± 0,17	2,77 ± 0,57	nd	nd
	NA-GA _{IG}	15,83 ± 0,03	2,60 ± 0,10	26,93 ± 0,31	9,87 ± 0,21	nd
	NA-ŽEL _{IG}	9,75 ± 0,58	9,76 ± 0,00	2,39 ± 0,29	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	3,10 ± 0,17	18,13 ± 1,28	7,19 ± 0,76	3,71 ± 0,07	2,61 ± 0,13
Mirtilin klorid	CS-NIE	2,29 ± 0,03	-	nd	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	CS-NIE	0,96 ± 0,04	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid	CS-NIE	5,40 ± 0,04	-	6,29 ± 0,21	-	2,41 ± 0,42
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	1,12 ± 0,18	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Kuromanin klorid	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određen uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (μg/100 mgE) ± SD.

Tablica P1.2 Maseni udio **pojedinačnih fenolnih spojeva** iz neinkapsuliranog **ekstrakta tropa grožđa cabernet franc (CF-NIE)** te inkapsuliranog CF ekstrakta **ionskim geliranjem** pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) **tijekom tri faze in vitro** simulirane **probave**

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Fenolne kiseline (µg/100 mgE)						
Galna kiselina	CF-NIE	2,09 ± 0,06	-	1,19 ± 0,17	-	141,38 ± 6,37
	NA _{IG}	4,32 ± 1,49	10,75 ± 0,62	13,38 ± 0,27	146,65 ± 8,57	170,14 ± 2,39
	NA-GA _{IG}	3,40 ± 0,09	9,08 ± 0,51	7,41 ± 0,47	67,19 ± 1,63	40,82 ± 3,76
	NA-ŽEL _{IG}	2,71 ± 0,80	12,29 ± 0,84	8,51 ± 0,46	454,44 ± 7,72	430,49 ± 25,37
	NA(1,5KZ) _{IG}	1,00 ± 0,07	12,45 ± 0,07	8,94 ± 0,40	181,46 ± 6,75	158,67 ± 14,97
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	17,01 ± 0,08
	NA _{IG}	nd	nd	nd	81,61 ± 1,62	55,88 ± 0,07
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	37,86 ± 4,62	31,49 ± 6,46
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	171,89 ± 4,48	170,71 ± 2,40
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	73,97 ± 0,55	73,52 ± 0,20
Vanilinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	4,39 ± 0,00
	NA _{IG}	nd	nd	nd	3,39 ± 0,20	3,33 ± 0,20
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	3,57 ± 0,43	4,38 ± 0,6
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Siringinska kiselina	CF-NIE	6,92 ± 0,78	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	5,97 ± 0,26	4,46 ± 0,48	3,78 ± 0,14	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	13,41 ± 1,25	10,18 ± 0,15	12,77 ± 0,46	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	3,52 ± 0,12	3,09 ± 0,85	1,47 ± 0,33	nd	nd
Elaginska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	1,28 ± 0,00
	NA _{IG}	1,72 ± 0,17	1,21 ± 0,07	10,62 ± 0,07	8,83 ± 0,34	7,58 ± 0,48
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	3,57 ± 0,09	2,66 ± 0,09
	NA-ŽEL _{IG}	nd	9,74 ± 0,15	17,41 ± 0,85	28,05 ± 0,77	25,90 ± 0,90
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	8,05 ± 0,00	12,00 ± 0,77	9,93 ± 0,41	8,50 ± 0,87
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	9,37 ± 0,06

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{IG}	nd	5,18 ± 0,34	28,19 ± 0,31	94,87 ± 1,48	99,24 ± 4,17
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	13,97 ± 0,43	32,60 ± 0,0
	NA-ŽEL _{IG}	nd	24,04 ± 1,38	45,73 ± 1,08	169,05 ± 8,80	196,72 ± 1,65
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	20,97 ± 1,02	36,44 ± 2,21	103,49 ± 0,55	122,22 ± 7,85
	CF-NIE	0,43 ± 0,06	-	0,44 ± 0,00	-	3,93 ± 0,70
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
Kafeinska kiselina	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
Ferulinska kiselina	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
Flavanoli (µg/100 mgE)						
Epikatehin	CF-NIE	343,19 ± 7,06	-	324,16 ± 4,16	-	nd
	NA _{IG}	103,34 ± 3,19	96,80 ± 5,58	157,44 ± 9,33	623,83 ± 6,61	636,60 ± 3,55
	NA-GA _{IG}	20,47 ± 2,39	34,17 ± 4,84	29,41 ± 0,65	432,13 ± 13,94	487,83 ± 8,73
	NA-ŽEL _{IG}	143,95 ± 2,24	215,73 ± 8,19	299,42 ± 3,78	1426,41 ± 46,30	1236,81 ± 41,14
	NA(1,5KZ) _{IG}	72,30 ± 14,26	116,34 ± 12,83	103,73 ± 10,84	737,72 ± 2,32	785,29 ± 29,74
Katehin	CF-NIE	100,95 ± 12,01	-	139,84 ± 2,90	-	nd
	NA _{IG}	97,13 ± 0,12	59,43 ± 7,26	89,82 ± 5,11	nd	nd
	NA-GA _{IG}	8,71 ± 0,75	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	97,50 ± 5,28	72,00 ± 2,91	159,67 ± 2,78	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	71,59 ± 11,92	54,40 ± 4,40	43,89 ± 1,10	nd	nd
Epikatehin galat	CF-NIE	nd	-	nd	-	32,06 ± 0,06
	NA _{IG}	1,78 ± 0,29	28,87 ± 2,74	252,98 ± 9,29	152,67 ± 0,47	112,04 ± 6,01
	NA-GA _{IG}	nd	14,56 ± 0,73	18,10 ± 1,03	36,77 ± 1,71	38,04 ± 3,84
	NA-ŽEL _{IG}	nd	143,84 ± 4,67	265,58 ± 2,39	209,21 ± 2,32	148,42 ± 6,61

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Galokatehin galat	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	182,64 ± 20,99	298,14 ± 3,75	222,60 ± 0,14	154,45 ± 6,04
	CF-NIE	nd	-	nd	-	190,83 ± 6,03
	NA _{IG}	nd	nd	nd	534,78 ± 8,64	482,16 ± 10,38
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	470,59 ± 5,56	530,25 ± 2,36
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	937,70 ± 18,83	951,97 ± 2,55
	NA(1,5KZ) _{IG}	88,59 ± 3,48	316,51 ± 32,27	211,18 ± 2,04	507,84 ± 4,98	507,53 ± 13,36
Procijanidin B1	CF-NIE	60,20 ± 0,10	-	72,36 ± 7,13	-	nd
	NA _{IG}	30,90 ± 1,54	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Procijanidin B2	CF-NIE	111,71 ± 5,15	-	137,25 ± 3,75	-	nd
	NA _{IG}	34,90 ± 2,09	33,25 ± 4,69	145,90 ± 5,76	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	28,96 ± 1,00	60,84 ± 5,79	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	38,76 ± 8,90	76,93 ± 7,28	107,92 ± 4,72	nd	nd
Flavonoli (µg/100 mgE)						
Kvercetin	CF-NIE _F	19,62 ± 0,67	-	15,89 ± 0,38	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	CF-NIE	46,81 ± 0,68	-	64,19 ± 0,00	-	18,86 ± 1,80
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
ε-Viniferin	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
<i>Antocijani (μg/100 mg_E)</i>						
Oenin klorid	CF-NIE	511,54 ± 1,17	-	733,77 ± 1,11	-	259,78 ± 23,24
	NA _{IG}	19,98 ± 3,19	107,15 ± 0,07	123,50 ± 1,92	nd	nd
	NA-GA _{IG}	97,40 ± 11,69	79,06 ± 4,45	96,19 ± 1,55	45,96 ± 0,17	41,25 ± 0,17
	NA-ŽEL _{IG}	3,66 ± 0,15	178,32 ± 1,53	198,52 ± 8,33	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	120,99 ± 0,17	90,06 ± 1,74	nd	nd
Mirtilin klorid	CF-NIE	7,98 ± 0,30	-	6,73 ± 0,01	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	CF-NIE	3,11 ± 0,17	-	3,62 ± 0,22	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid	CF-NIE	45,42 ± 0,90	-	61,59 ± 1,32	-	18,64 ± 2,23
	NA _{IG}	1,66 ± 0,67	10,03 ± 0,07	9,60 ± 0,27	nd	nd
	NA-GA _{IG}	8,07 ± 1,83	4,84 ± 0,77	5,91 ± 0,00	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	13,48 ± 0,08	13,48 ± 0,85	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	7,16 ± 0,10	6,34 ± 0,54	nd	nd
Kuromanin klorid	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Kalistefin klorid	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost ($\mu\text{g}/100 \text{ mgE}$) $\pm$ SD.

Tablica P1.3 Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranog ekstrakta tropa merlot (M-NIE) te inkapsuliranog M ekstrakta ionskim geliranjem pomoću različitih omotača (NA_{IG}, NA-GA_{IG}, NA-ŽEL_{IG}, NA(1,5KZ)_{IG}) tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
<i>Fenolne kiseline (µg/100 mgE)</i>						
Galna kiselina	M-NIE	1,57 ± 0,16	-	1,61 ± 0,04	-	98,41 ± 0,59
	NA _{IG}	1,03 ± 0,03	5,50 ± 0,69	4,01 ± 0,31	101,39 ± 14,22	134,24 ± 8,96
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	326,55 ± 0,18	278,14 ± 23,23
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	273,74 ± 24,45	198,88 ± 3,75
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	30,71 ± 0,74	19,13 ± 1,28
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	9,33 ± 0,17
	NA _{IG}	nd	nd	nd	33,32 ± 0,95	30,87 ± 2,24
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	21,34 ± 0,09	24,01 ± 0,36
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	86,12 ± 4,80	76,82 ± 6,74
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	14,34 ± 1,34	15,14 ± 0,34
Vanilinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	2,72 ± 0,08
	NA _{IG}	nd	nd	nd	5,79 ± 0,34	5,28 ± 0,41
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	5,89 ± 0,09	8,09 ± 0,18
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Siringinska kiselina	M-NIE	12,14 ± 2,90	-	11,88 ± 0,13	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Elaginska kiselina	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	2,52 ± 0,08
	NA _{IG}	nd	7,30 ± 0,07	11,73 ± 0,27	9,62 ± 0,34	7,68 ± 0,54
	NA-GA _{IG}	nd	11,65 ± 0,04	16,00 ± 0,44	2,53 ± 0,00	2,72 ± 0,27
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	NA-ŽEL _{IG}	nd	8,37 ± 0,22	18,35 ± 0,29	2,65 ± 0,45	2,65 ± 0,15
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	5,92 ± 0,06
	NA _{IG}	nd	22,83 ± 0,24	33,95 ± 0,10	88,03 ± 3,32	102,65 ± 15,21
	NA-GA _{IG}	nd	37,88 ± 1,48	50,38 ± 0,18	100,03 ± 0,54	114,74 ± 6,79
	NA-ŽEL _{IG}	nd	27,30 ± 2,43	51,58 ± 2,27	155,27 ± 7,20	194,22 ± 2,55
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	19,51 ± 1,28	30,00 ± 0,27
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	M-NIE	0,28 ± 0,03	-	0,36 ± 0,03	-	2,16 ± 0,08
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
Kafeinska kiselina	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mg_E)						
Epikatehin	M-NIE	190,58 ± 9,18	-	200,57 ± 2,08	-	38,79 ± 0,53

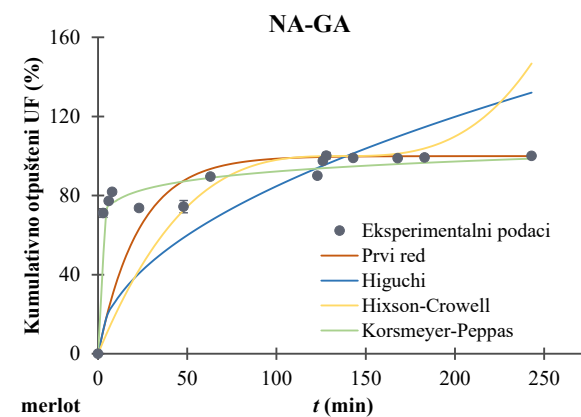
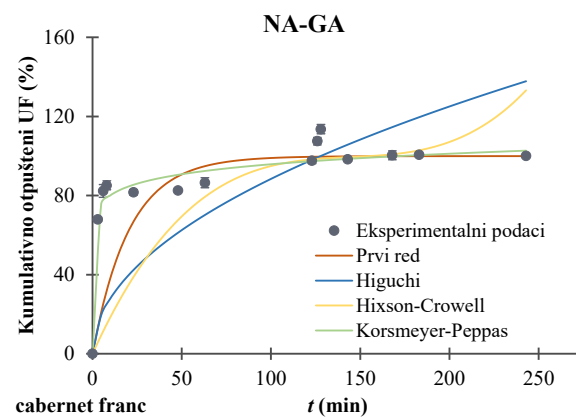
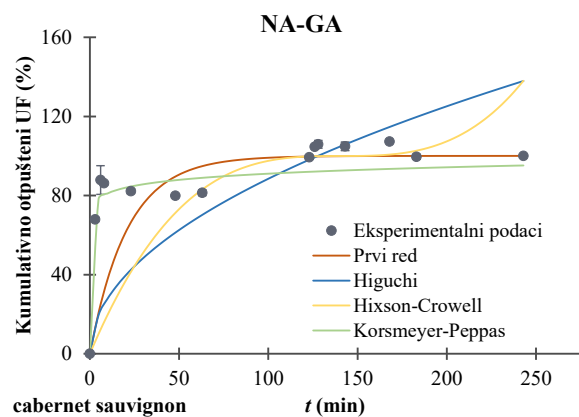
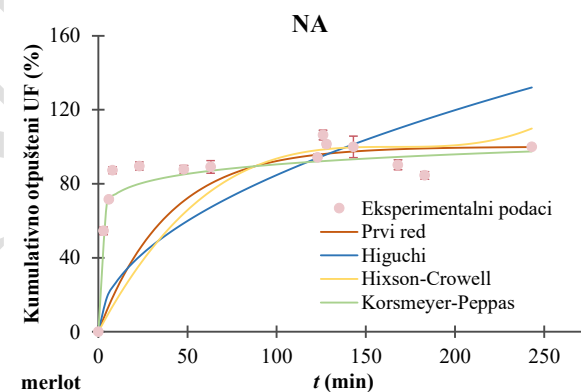
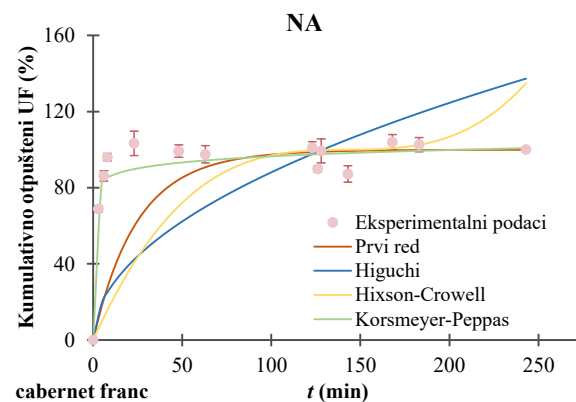
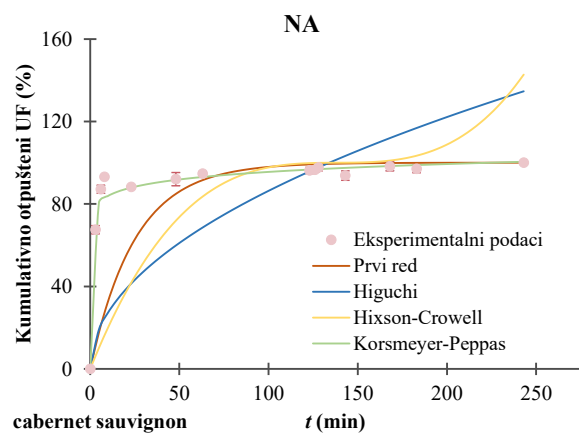
Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{IG}	58,22 ± 1,82	91,63 ± 0,96	97,87 ± 1,80	853,16 ± 11,98	732,88 ± 41,35
	NA-GA _{IG}	36,74 ± 6,13	124,07 ± 5,03	114,66 ± 8,35	884,74 ± 6,71	692,12 ± 12,51
	NA-ŽEL _{IG}	89,39 ± 0,73	148,85 ± 4,63	161,17 ± 16,20	1507,45 ± 19,35	1323,28 ± 7,94
	NA(1,5KZ) _{IG}	17,19 ± 0,03	17,35 ± 3,51	15,73 ± 0,00	388,79 ± 6,18	368,99 ± 7,45
	M-NIE	101,90 ± 6,52	-	98,69 ± 1,03	-	nd
Katehin	NA _{IG}	48,73 ± 2,95	17,58 ± 1,75	18,02 ± 0,00	nd	nd
	NA-GA _{IG}	7,20 ± 0,79	22,73 ± 0,00	14,13 ± 1,41	62,80 ± 1,61	67,86 ± 10,90
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	172,03 ± 21,00	158,72 ± 11,39
	NA(1,5KZ) _{IG}	8,97 ± 0,00	nd	nd	23,93 ± 1,07	33,42 ± 0,13
	M-NIE	nd	-	nd	-	7,35 ± 0,73
Epikatehin galat	NA _{IG}	nd	206,58 ± 7,33	284,70 ± 2,58	131,45 ± 0,27	67,45 ± 0,61
	NA-GA _{IG}	nd	402,32 ± 2,24	456,21 ± 28,11	118,20 ± 2,24	82,83 ± 2,95
	NA-ŽEL _{IG}	nd	126,70 ± 1,10	273,51 ± 13,93	272,15 ± 1,80	226,11 ± 3,00
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	16,07 ± 0,56	15,21 ± 0,00	37,64 ± 1,14	30,71 ± 0,74
	M-NIE	104,18 ± 3,47	-	114,91 ± 2,29	-	178,11 ± 0,17
Galokatehin galat	NA _{IG}	nd	240,38 ± 22,87	234,07 ± 18,72	505,97 ± 2,57	533,59 ± 25,26
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	556,99 ± 2,69	647,70 ± 25,47
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	889,01 ± 50,70	953,92 ± 1,95
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	363,91 ± 2,01	402,03 ± 1,54
	M-NIE	28,71 ± 0,46	-	44,79 ± 5,83	-	nd
Procijanidin B1	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	43,05 ± 1,79	48,21 ± 2,59
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	58,30 ± 2,27	-	61,28 ± 0,54	-	nd
Procijanidin B2	NA _{IG}	16,55 ± 0,15	47,59 ± 2,37	57,98 ± 2,14	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	36,72 ± 1,97	36,39 ± 0,36
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	50,49 ± 7,20	52,34 ± 1,80
	NA(1,5KZ) _{IG}	6,97 ± 0,00	nd	nd	nd	nd
Flavonoli (µg/100 mg_E)						
Kvercetin	M-NIE	13,12 ± 0,81	-	5,93 ± 0,31	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

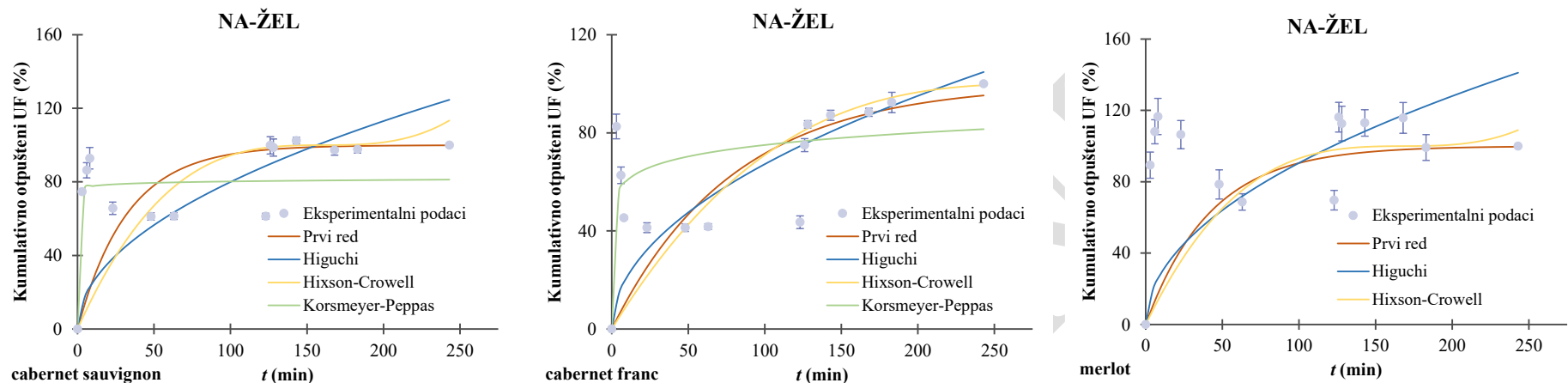
Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Rutin	M-NIE	7,00 ± 1,00	-	8,30 ± 0,01	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Stilbeni (µg/100 mgE)</i>						
Resveratrol	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
ε-Viniferin	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Antocijani (µg/100 mgE)</i>						
Oenin klorid	M-NIE	26,58 ± 0,64	-	38,08 ± 0,28	-	20,56 ± 1,49
	NA _{IG}	1,67 ± 0,36	0,97 ± 0,00	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	3,95 ± 0,88	3,06 ± 0,51	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	3,25 ± 0,27	5,59 ± 0,63	5,05 ± 0,23	2,56 ± 0,00	nd
Mirtilin klorid	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	M-NIE	0,27 ± 0,01	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid klorid	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	5,49 ± 0,20	-	7,34 ± 0,13	-	3,04 ± 0,42
	NA _{IG}	0,34 ± 0,07	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
Kuromanin klorid	NA(1,5KZ) _{IG}	0,33 ± 0,03	1,50 ± 0,60	0,81 ± 0,00	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA(1,5KZ) _{IG}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određen uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (μg/100 mgE) ± SD.

7.2. Prilog 2. Inkapsulacija sušenjem zamrzavanjem





Slika P2.1 Kinetika otpuštanja UF-a iz CS, CF i M inkapsulata pripremljenih pomoću inkapsulacije sušenjem zamrzavanjem primjenom različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) (simboli - eksperimentalni podaci, linije - aproksimativne krivulje prema različitim matematičkim modelima)

Tablica P2.1 Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva iz neinkapsuliranog ekstrakta tropa cabernet sauvignon (CS-NIE) te inkapsuliranog CS ekstrakta sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Fenolne kiseline (µg/100 mgE)						
Galna kiselina	CS-NIE	0,70 ± 0,04	-	1,25 ± 0,01	-	36,26 ± 1,29
	NA _{Sz}	3,49 ± 0,37	14,19 ± 0,70	9,94 ± 0,11	37,44 ± 1,89	7,81 ± 0,92
	NA-GA _{Sz}	1,81 ± 0,02	7,77 ± 0,00	13,98 ± 1,69	66,39 ± 0,39	52,84 ± 0,84
	NA-ŽEL _{Sz}	3,66 ± 0,03	6,93 ± 0,10	5,85 ± 0,36	41,98 ± 1,13	42,46 ± 7,08
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	11,36 ± 0,37
	NA _{Sz}	nd	nd	nd	9,80 ± 0,84	6,41 ± 0,18
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	22,01 ± 0,13	17,89 ± 0,45
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	nd	nd	11,50 ± 0,41	19,52 ± 0,10
Vanilinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	2,39 ± 0,11
	NA _{Sz}	nd	nd	nd	3,86 ± 0,09	4,42 ± 0,62
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	4,52 ± 0,06	5,99 ± 0,19
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	nd	nd	6,26 ± 0,82	7,40 ± 0,62

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Siringinska kiselina	CS-NIE	9,94 ± 0,04	-	3,10 ± 0,06	-	nd
	NA _{SZ}	3,89 ± 0,09	3,84 ± 0,37	3,59 ± 0,15	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	3,79 ± 0,00	4,53 ± 0,06	4,93 ± 0,49	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	4,57 ± 0,44	4,52 ± 0,62	4,76 ± 0,67	nd	nd
Elaginska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	1,63 ± 0,11
	NA _{SZ}	nd	2,10 ± 0,07	2,18 ± 0,13	13,66 ± 0,31	12,67 ± 0,40
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	2,37 ± 0,00	6,18 ± 0,06
	NA-ŽEL _{SZ}	1,42 ± 0,52	3,21 ± 0,10	4,55 ± 0,87	30,85 ± 2,06	25,84 ± 0,62
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	5,87 ± 0,93
	NA _{SZ}	10,96 ± 0,41	21,80 ± 0,11	22,08 ± 0,24	16,53 ± 0,57	15,65 ± 0,31
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	29,54 ± 0,45	26,35 ± 0,39
	NA-ŽEL _{SZ}	15,91 ± 0,70	18,23 ± 0,62	30,29 ± 2,31	18,55 ± 1,34	15,46 ± 1,74
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	CS-NIE	0,59 ± 0,14	-	0,21 ± 0,07	-	2,99 ± 0,11
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	4,64 ± 0,04	0,68 ± 0,00
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Kafeinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mg_E)						
Epikatehin	CS-NIE	79,11 ± 1,67	-	34,62 ± 0,71	-	50,19 ± 1,13
	NA _{SZ}	47,93 ± 0,70	92,28 ± 0,84	87,55 ± 3,57	275,31 ± 1,06	261,25 ± 6,43
	NA-GA _{SZ}	33,06 ± 0,06	78,24 ± 0,06	102,89 ± 7,62	297,23 ± 0,39	247,32 ± 8,80
	NA-ŽEL _{SZ}	79,90 ± 1,08	101,49 ± 1,34	182,25 ± 17,90	287,26 ± 18,11	224,20 ± 0,10
Katehin	CS-NIE	61,78 ± 1,82	-	12,14 ± 0,57	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{SZ}	59,59 ± 0,64	55,82 ± 3,06	66,85 ± 1,28	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	40,33 ± 0,02	56,31 ± 0,10	67,50 ± 6,64	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	54,37 ± 5,44	24,64 ± 4,74	74,91 ± 2,26	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	6,99 ± 0,16	-	6,75 ± 0,76
Epikatehin galat	NA _{SZ}	nd	24,12 ± 0,04	27,89 ± 0,75	26,61 ± 0,04	33,64 ± 2,86
	NA-GA _{SZ}	nd	13,35 ± 0,13	15,59 ± 0,52	37,67 ± 0,32	38,11 ± 0,19
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	6,69 ± 0,10	55,44 ± 6,59	55,38 ± 0,72
	CS-NIE	nd	-	nd	-	182,35 ± 7,51
Galokatehin galat	NA _{SZ}	nd	nd	nd	333,26 ± 3,17	330,87 ± 8,58
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	426,04 ± 0,58	478,95 ± 12,75
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	671,87 ± 19,14	716,07 ± 5,75
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
Procijanidin B1	NA _{SZ}	21,28 ± 1,36	21,43 ± 3,50	18,75 ± 5,57	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	22,85 ± 0,34	-	8,81 ± 0,07	-	nd
Procijanidin B2	NA _{SZ}	14,38 ± 0,23	19,62 ± 1,17	18,24 ± 0,75	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	7,98 ± 0,02	11,71 ± 0,06	15,68 ± 1,36	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	10,01 ± 0,90	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	17,75 ± 0,06	-	1,60 ± 0,08	-	nd
Kvercetin	NA _{SZ}	13,34 ± 0,18	17,60 ± 0,86	17,86 ± 0,31	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	7,70 ± 0,77	7,84 ± 1,50	11,67 ± 0,36	nd	nd
	CS-NIE	4,95 ± 0,13	-	2,53 ± 0,07	-	nd
Rutin	NA _{SZ}	2,79 ± 0,53	3,25 ± 0,07	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
Kempferol	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
Flavonoli (µg/100 mgE)						
Kvercetin	NA _{SZ}	17,75 ± 0,06	-	1,60 ± 0,08	-	nd
	NA-GA _{SZ}	13,34 ± 0,18	17,60 ± 0,86	17,86 ± 0,31	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	7,70 ± 0,77	7,84 ± 1,50	11,67 ± 0,36	nd	nd
Rutin	NA _{SZ}	4,95 ± 0,13	-	2,53 ± 0,07	-	nd
	NA-GA _{SZ}	2,79 ± 0,53	3,25 ± 0,07	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
Kempferol	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
ε-Viniferin	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Antocijani (μg/100 mg_E)						
Oenin klorid	CS-NIE	47,12 ± 0,25	-	64,71 ± 0,01	-	31,42 ± 2,56
	NA _{SZ}	28,57 ± 0,36	50,48 ± 0,35	46,26 ± 0,37	8,62 ± 0,13	7,91 ± 0,18
	NA-GA _{SZ}	40,73 ± 3,87	15,23 ± 0,52	15,86 ± 0,26	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	57,80 ± 1,01	44,69 ± 1,96	44,03 ± 1,29	13,53 ± 0,62	12,92 ± 0,21
Mirtilin klorid	CS-NIE	2,29 ± 0,03	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	CS-NIE	0,96 ± 0,04	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	CS-NIE	5,40 ± 0,04	-	6,29 ± 0,21	-	2,41 ± 0,42
	NA _{SZ}	2,36 ± 0,21	4,39 ± 0,48	3,53 ± 0,24	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	3,66 ± 0,34	1,81 ± 0,29	1,60 ± 0,13	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	4,08 ± 0,52	3,17 ± 0,77	2,65 ± 0,26	nd	nd
Kuromanin klorid	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (μg/100 mg_E) ± SD.

Tablica P2.2 Maseni udio **pojedinačnih fenolnih spojeva** iz neinkapsuliranog **ekstrakta tropa grožđa cabernet franc (CF-NIE)** te iz inkapsuliranog CF ekstrakta sušenjem zamrzavanjem pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) **tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave**

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
<i>Fenolne kiseline (µg/100 mgE)</i>						
Galna kiselina	CF-NIE	2,09 ± 0,06	-	1,19 ± 0,17	-	141,38 ± 6,37
	NA _{Sz}	0,86 ± 0,16	5,17 ± 0,96	3,16 ± 0,37	4,79 ± 0,00	16,01 ± 0,75
	NA-GA _{Sz}	nd	6,15 ± 1,96	2,72 ± 0,51	102,85 ± 7,20	90,77 ± 1,22
	NA-ŽEL _{Sz}	2,93 ± 0,08	8,47 ± 0,16	3,94 ± 0,11	11,65 ± 0,31	9,51 ± 0,00
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	17,01 ± 0,08
	NA _{Sz}	nd	nd	nd	13,95 ± 0,00	8,61 ± 0,04
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	32,76 ± 1,99	30,00 ± 0,51
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	nd	nd	5,64 ± 0,21	15,90 ± 0,00
Vanilinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	4,39 ± 0,00
	NA _{Sz}	nd	nd	nd	3,92 ± 0,00	3,89 ± 0,13
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	5,59 ± 0,58	5,23 ± 0,06
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	nd	nd	6,23 ± 0,00	6,98 ± 0,00
Siringinska kiselina	CF-NIE	6,92 ± 0,78	-	nd	-	nd
	NA _{Sz}	3,49 ± 0,07	5,79 ± 0,09	3,75 ± 0,77	nd	nd
	NA-GA _{Sz}	9,51 ± 0,66	6,85 ± 0,51	8,92 ± 0,80	2,23 ± 0,19	2,36 ± 0,26
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	nd	nd	nd	nd
Elaginska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	1,28 ± 0,00
	NA _{Sz}	nd	1,41 ± 0,15	1,73 ± 0,07	13,01 ± 0,00	13,46 ± 0,13
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	9,54 ± 1,67	9,68 ± 0,45
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	1,57 ± 0,21	1,60 ± 0,05	16,77 ± 0,00	19,16 ± 0,00
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{Sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{Sz}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	9,37 ± 0,06
	NA _{Sz}	20,41 ± 0,20	27,06 ± 0,72	25,98 ± 0,57	18,49 ± 0,00	21,54 ± 0,66
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	68,42 ± 5,78	82,63 ± 2,57
	NA-ŽEL _{Sz}	17,23 ± 1,37	21,67 ± 1,21	22,92 ± 1,16	15,58 ± 0,00	19,76 ± 0,00
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	CF-NIE	0,43 ± 0,06	-	0,44 ± 0,00	-	3,93 ± 0,70
	NA _{Sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{Sz}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Kafeinska kiselina	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mg_E)						
Epikatehin	CF-NIE	343,19 ± 7,06	-	324,16 ± 4,16	-	nd
	NA _{sz}	160,11 ± 4,18	171,72 ± 0,64	180,02 ± 6,53	200,24 ± 0,00	167,33 ± 1,10
	NA-GA _{sz}	210,82 ± 0,90	352,28 ± 7,83	417,18 ± 4,40	100,63 ± 8,93	80,82 ± 2,31
	NA-ŽEL _{sz}	154,16 ± 4,14	185,78 ± 5,80	155,10 ± 1,26	107,82 ± 3,88	164,60 ± 1,68
Katehin	CF-NIE	100,95 ± 12,01	-	139,84 ± 2,90	-	nd
	NA _{sz}	102,30 ± 2,23	77,12 ± 0,15	49,66 ± 3,21	nd	nd
	NA-GA _{sz}	118,90 ± 0,08	96,28 ± 1,51	90,47 ± 8,70	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	21,09 ± 0,66	42,90 ± 1,37	45,21 ± 1,21	nd	nd
Epikatehin galat	CF-NIE	nd	-	nd	-	32,06 ± 0,06
	NA _{sz}	nd	nd	nd	27,46 ± 0,00	25,68 ± 1,06
	NA-GA _{sz}	nd	nd	nd	47,61 ± 3,34	51,82 ± 2,83
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	61,29 ± 2,52	54,82 ± 0,00
Galokatehin galat	CF-NIE	nd	-	nd	-	190,83 ± 6,03
	NA _{sz}	nd	nd	nd	381,74 ± 0,00	374,86 ± 5,85
	NA-GA _{sz}	nd	nd	nd	443,58 ± 6,17	450,08 ± 1,41
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	558,30 ± 1,68	601,79 ± 0,00
Procijanidin B1	CF-NIE	60,20 ± 0,10	-	72,36 ± 7,13	-	nd
	NA _{sz}	81,43 ± 6,36	61,88 ± 2,52	49,69 ± 3,26	nd	nd
	NA-GA _{sz}	68,20 ± 3,38	61,72 ± 4,24	66,34 ± 1,73	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	24,87 ± 4,01	nd	nd	nd	nd
Procijanidin B2	CF-NIE	111,71 ± 5,15	-	137,25 ± 3,75	-	nd
	NA _{sz}	3,49 ± 0,07	5,79 ± 0,09	3,75 ± 0,77	nd	nd
	NA-GA _{sz}	64,41 ± 0,29	65,10 ± 4,08	92,86 ± 3,02	24,12 ± 4,95	34,95 ± 6,36
	NA-ŽEL _{sz}	31,92 ± 0,05	28,87 ± 0,95	38,66 ± 3,74	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Flavonoli (µg/100 mgE)						
Kvercetin	CF-NIE	19,62 ± 0,67	-	15,89 ± 0,38	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	CF-NIE	46,81 ± 0,68	-	64,19 ± 0,00	-	18,86 ± 1,80
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
ε-Viniferin	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Antocijani (µg/100 mgE)						
Oenin klorid	CF-NIE	511,54 ± 1,17	-	733,77 ± 1,11	-	259,78 ± 23,24
	NA _{SZ}	355,94 ± 2,52	224,77 ± 12,53	219,88 ± 33,29	61,27 ± 3,61	96,68 ± 10,81
	NA-GA _{SZ}	378,04 ± 18,53	277,57 ± 2,05	306,86 ± 19,26	61,97 ± 1,28	65,32 ± 4,56
	NA-ŽEL _{SZ}	310,17 ± 0,24	254,76 ± 0,58	248,77 ± 0,26	60,92 ± 0,94	49,10 ± 4,31
Mirtilin klorid	NIE _{CF}	7,98 ± 0,30	-	6,73 ± 0,01	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	CF-NIE	3,11 ± 0,17	-	3,62 ± 0,22	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	CF-NIE	45,42 ± 0,90	-	61,59 ± 1,32	-	18,64 ± 2,23
	NA _{sz}	28,84 ± 1,23	16,32 ± 0,70	19,68 ± 2,71	4,36 ± 0,18	7,24 ± 0,31
	NA-GA _{sz}	29,92 ± 1,97	20,60 ± 0,06	22,77 ± 2,09	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	22,91 ± 1,61	19,44 ± 0,58	18,79 ± 0,58	nd	nd
Kuromanin klorid	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
Kalistefin klorid	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{sz}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (μg/100 mg_E) ± SD.

Tablica P2.3 Maseni udio **pojedinačnih fenolnih spojeva** iz neinkapsuliranog ekstrakta tropa merlot (M-NIE) te inkapsuliranog M ekstrakta **sušenjem zamrzavanjem** pomoću različitih omotača (NA_{SZ}, NA-GA_{SZ}, NA-ŽEL_{SZ}) **tijekom tri faze in vitro** simulirane **probave**

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Fenolne kiseline (µg/100 mg _E)						
Galna kiselina	M-NIE	1,57 ± 0,16	-	1,61 ± 0,04	-	98,41 ± 0,59
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	78,31 ± 9,37	30,06 ± 0,26
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	113,77 ± 1,33	95,89 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	101,35 ± 4,29	183,87 ± 0,61
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	9,33 ± 0,17
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	17,19 ± 0,60	8,59 ± 0,04
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	21,94 ± 0,51	23,50 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	24,18 ± 1,33	35,90 ± 0,51
Vanilinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	2,72 ± 0,08
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	3,80 ± 0,64	4,04 ± 0,30
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	6,13 ± 0,19	6,52 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	5,20 ± 0,20	6,55 ± 0,10
Siringinska kiselina	M-NIE	12,14 ± 2,90	-	11,88 ± 0,13	-	nd
	NA _{SZ}	3,49 ± 0,01	2,77 ± 0,19	4,09 ± 0,00	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	7,04 ± 0,76	3,25 ± 0,60	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	5,38 ± 0,03	nd	nd	nd	nd
Elaginska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	2,52 ± 0,08
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	2,37 ± 0,17	3,13 ± 0,04
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	4,52 ± 0,19	6,12 ± 0,19
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	11,62 ± 1,33	13,16 ± 0,51
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	5,92 ± 0,06
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	14,49 ± 0,13	15,49 ± 0,09
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	25,57 ± 2,22	23,24 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	28,87 ± 4,08	23,74 ± 2,44
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	M-NIE	0,28 ± 0,03	-	0,36 ± 0,03	-	2,16 ± 0,08
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd

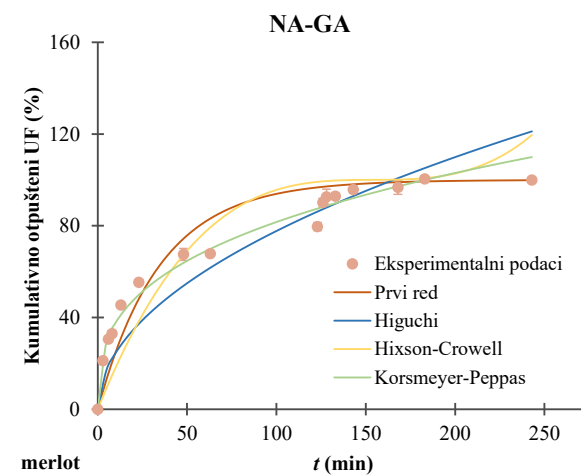
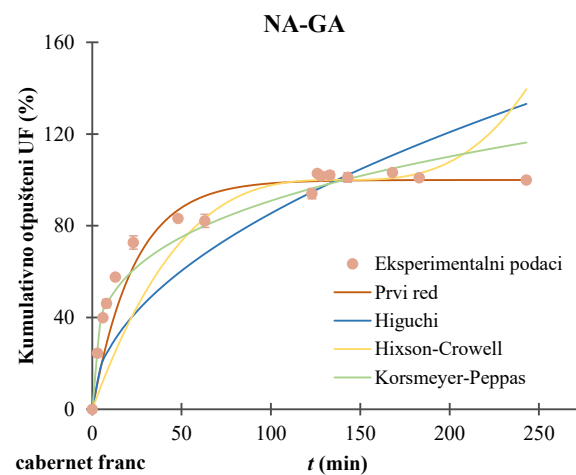
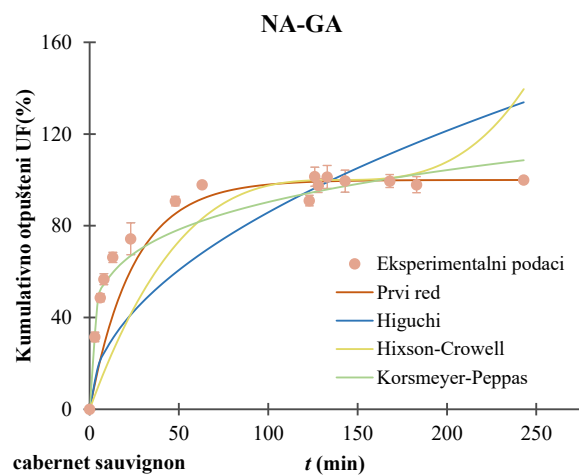
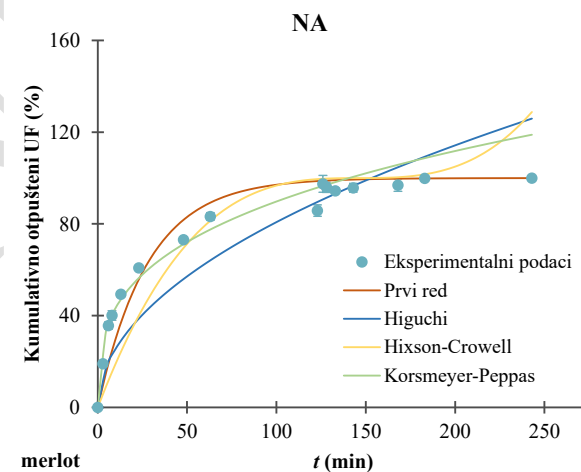
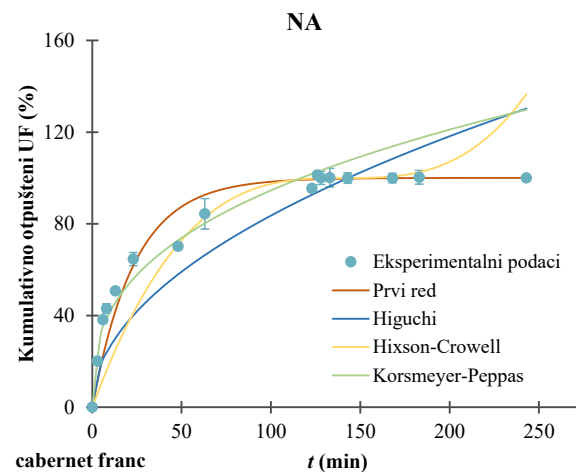
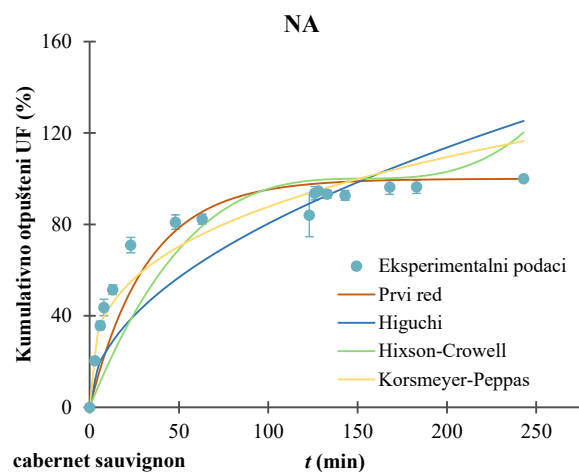
Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Kafeinska kiselina	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mgE)						
Epikatehin	M-NIE	190,58 ± 9,18	-	200,57 ± 2,08	-	38,79 ± 0,53
	NA _{SZ}	50,41 ± 0,00	181,44 ± 24,74	111,66 ± 0,00	219,09 ± 2,49	221,07 ± 3,99
	NA-GA _{SZ}	138,47 ± 5,04	212,47 ± 20,05	167,31 ± 6,31	266,94 ± 11,40	227,80 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	103,49 ± 0,13	104,19 ± 0,00	179,46 ± 2,04	279,58 ± 8,88	223,65 ± 16,18
Katehin	M-NIE	101,90 ± 6,52	-	98,69 ± 1,03	-	nd
	NA _{SZ}	58,13 ± 0,10	52,31 ± 0,98	71,67 ± 0,00	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	68,05 ± 3,73	52,45 ± 2,16	36,20 ± 5,81	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	62,14 ± 0,20	37,59 ± 0,00	73,99 ± 0,61	69,16 ± 11,03	56,83 ± 1,02
Epikatehin galat	M-NIE	nd	-	nd	-	7,35 ± 0,73
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	26,40 ± 1,16	27,54 ± 1,07
	NA-GA _{SZ}	nd	17,68 ± 1,46	17,79 ± 0,28	35,91 ± 4,69	39,32 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	53,06 ± 3,57	59,13 ± 2,44
Galokatehin galat	M-NIE	104,18 ± 3,47	-	114,91 ± 2,29	-	178,11 ± 0,17
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	269,21 ± 1,46	277,94 ± 2,58
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	405,34 ± 0,82	442,38 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	747,57 ± 27,97	782,73 ± 7,63
Flavanoli (µg/100 mgE)						
Procijanidin B1	M-NIE	28,71 ± 0,46	-	44,79 ± 5,83	-	nd
	NA _{SZ}	27,64 ± 0,00	27,82 ± 2,35	38,08 ± 0,00	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	38,59 ± 1,25	27,73 ± 1,08	18,21 ± 3,28	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Procijanidin B2	M-NIE	58,30 ± 2,27	-	61,28 ± 0,54	-	nd
	NA _{SZ}	14,74 ± 0,00	28,74 ± 0,19	19,83 ± 0,00	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	40,40 ± 1,49	23,78 ± 2,03	21,67 ± 2,81	nd	nd

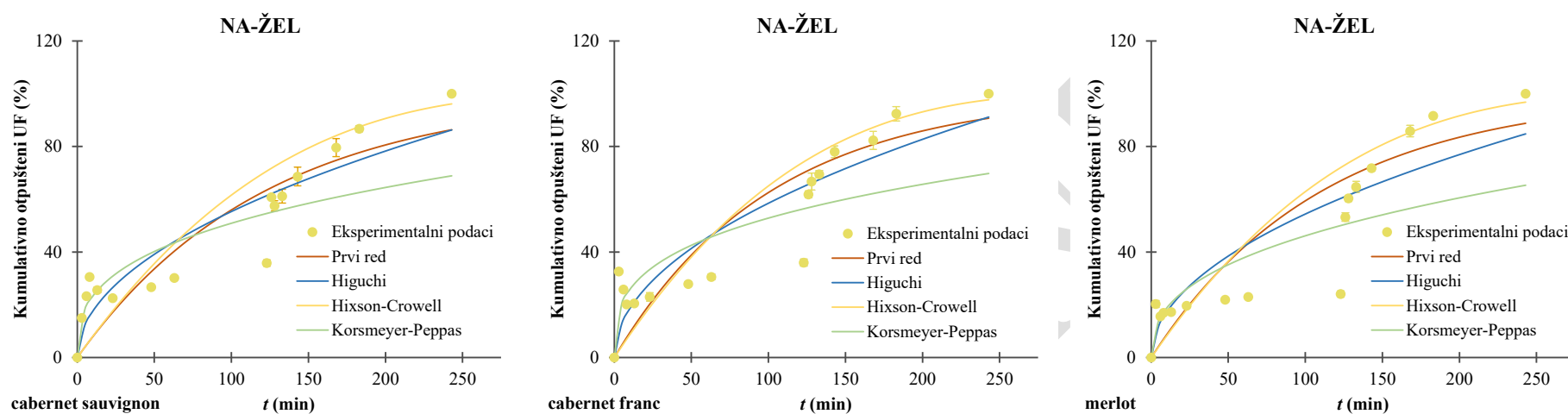
Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Kvercetin	NA-ŽEL _{SZ}	12,15 ± 0,13	55,77 ± 0,00	50,29 ± 0,10	nd	nd
	M-NIE	13,12 ± 0,81	-	5,93 ± 0,31	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	M-NIE	7,00 ± 1,00	-	8,30 ± 0,01	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
ε-Viniferin	NIE _M	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Antocijani (µg/100 mgE)						
Oenin klorid	M-NIE	26,58 ± 0,64	-	38,08 ± 0,28	-	20,56 ± 1,49
	NA _{SZ}	16,06 ± 1,29	13,09 ± 0,11	13,25 ± 0,00	9,27 ± 0,21	8,99 ± 0,09
	NA-GA _{SZ}	12,66 ± 0,21	6,44 ± 0,22	5,33 ± 0,16	3,90 ± 0,44	2,86 ± 0,13
	NA-ŽEL _{SZ}	14,26 ± 0,41	7,25 ± 0,46	9,11 ± 0,56	10,03 ± 0,10	8,06 ± 0,20
Mirtilin klorid	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	M-NIE	0,27 ± 0,01	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	M-NIE	5,49 ± 0,20	-	7,34 ± 0,13	-	3,04 ± 0,42
	NA _{SZ}	2,69 ± 0,09	2,42 ± 0,17	2,17 ± 0,17	2,25 ± 0,17	1,61 ± 0,04
	NA-GA _{SZ}	1,83 ± 0,05	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	2,14 ± 0,03	nd	nd	nd	nd
Kuromanin klorid	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SZ}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (μg/100 mg_E) ± SD.

7.3. Prilog 3. Inkapsulacija sušenjem raspršivanjem





Slika P3.1 Kinetika otpuštanja UF-a iz CS, CF i M inkapsulata pripremljenih pomoću inkapsulacije sušenjem raspršivanjem primjenom različitih omotača (NA_{SR} , $NA-GA_{SR}$, $NA-ŽEL_{SR}$) (simboli - eksperimentalni podaci, linije - aproksimativne krivulje prema različitim matematičkim modelima).

Tablica P3.1 Maseni udio **pojedinačnih fenolnih spojeva** iz neinkapsuliranog **ekstrakta tropa cabernet sauvignon (CS-NIE)** te inkapsuliranog CS ekstrakta **sušenjem raspršivanjem** pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) **tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave**

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Fenolne kiseline (µg/100 mgE)						
Galna kiselina	CS-NIE	0,70 ± 0,04	-	1,25 ± 0,01	-	36,26 ± 1,29
	NA _{SR}	nd	nd	nd	103,19 ± 1,10	69,28 ± 6,02
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	144,67 ± 10,70	189,45 ± 7,20
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	264,25 ± 6,74	349,09 ± 7,06
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	11,36 ± 0,37
	NA _{SR}	nd	nd	6,71 ± 1,04	42,42 ± 0,35	38,29 ± 1,80
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	60,40 ± 2,68	47,76 ± 4,63
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	95,57 ± 2,78	140,55 ± 2,35
Vanilinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	2,39 ± 0,11
	NA _{SR}	0,34 ± 0,00	4,16 ± 0,21	4,21 ± 0,42	4,54 ± 0,62	5,53 ± 0,07
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	7,93 ± 0,72	6,11 ± 0,21
	NA-ŽEL _{SR}	8,54 ± 0,48	1,40 ± 0,07	nd	8,28 ± 0,59	9,15 ± 0,29
Siringinska kiselina	CS-NIE	9,94 ± 0,04	-	3,10 ± 0,06	-	nd
	NA _{SR}	5,53 ± 0,21	54,22 ± 3,98	22,42 ± 0,55	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	4,43 ± 0,51	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	56,06 ± 0,48	21,74 ± 1,83	2,85 ± 0,22	nd	nd
Elaginska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	1,63 ± 0,11
	NA _{SR}	nd	nd	nd	9,18 ± 0,14	8,52 ± 0,42
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	9,97 ± 1,13	14,18 ± 1,75
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	16,05 ± 1,32	36,07 ± 0,15
p-Hidroksibenzojeva kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
o-Kumarinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	5,87 ± 0,93
	NA _{SR}	nd	nd	nd	27,58 ± 0,62	14,25 ± 1,18
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	24,09 ± 1,13	21,45 ± 2,78
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	34,38 ± 4,10	25,16 ± 2,35
p-Kumarinska kiselina	CS-NIE	0,59 ± 0,14	-	0,21 ± 0,07	-	2,99 ± 0,11
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Kafeinska kiselina	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mg_E)						
Epikatehin	CS-NIE	79,11 ± 1,67	-	34,62 ± 0,71	-	50,19 ± 1,13
	NA _{SR}	47,93 ± 0,70	92,28 ± 0,84	87,55 ± 3,57	275,31 ± 1,06	261,25 ± 6,43
	NA-GA _{SR}	33,06 ± 0,06	78,24 ± 0,06	102,89 ± 7,62	297,23 ± 0,39	247,32 ± 8,80
	NA-ŽEL _{SR}	79,90 ± 1,08	101,49 ± 1,34	182,25 ± 17,90	287,26 ± 18,11	224,20 ± 0,10
Katehin	CS-NIE	61,78 ± 1,82	-	12,14 ± 0,57	-	nd
	NA _{SR}	59,59 ± 0,64	55,82 ± 3,06	66,85 ± 1,28	nd	nd
	NA-GA _{SR}	40,33 ± 0,02	56,31 ± 0,10	67,50 ± 6,64	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	54,37 ± 5,44	24,64 ± 4,74	74,91 ± 2,26	nd	nd
Epikatehin galat	CS-NIE	nd	-	6,99 ± 0,16	-	6,75 ± 0,76
	NA _{SR}	nd	24,12 ± 0,04	27,89 ± 0,75	26,61 ± 0,04	33,64 ± 2,86
	NA-GA _{SR}	nd	13,35 ± 0,13	15,59 ± 0,52	37,67 ± 0,32	38,11 ± 0,19
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	6,69 ± 0,10	55,44 ± 6,59	55,38 ± 0,72
Galokatehin galat	CS-NIE	nd	-	nd	-	182,35 ± 7,51
	NA _{SR}	nd	nd	nd	333,26 ± 3,17	330,87 ± 8,58
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	426,04 ± 0,58	478,95 ± 12,75
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	671,87 ± 19,14	716,07 ± 5,75
Procijanidin B1	CS-NIE	21,28 ± 1,36	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	26,27 ± 0,02	21,43 ± 3,50	18,75 ± 5,57	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Procijanidin B2	CS-NIE	22,85 ± 0,34	-	8,81 ± 0,07	-	nd
	NA _{SR}	14,38 ± 0,23	19,62 ± 1,17	18,24 ± 0,75	nd	nd
	NA-GA _{SR}	7,98 ± 0,02	11,71 ± 0,06	15,68 ± 1,36	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	10,01 ± 0,90	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Flavonoli (µg/100 mgE)						
Kvercetin	CS-NIE	17,75 ± 0,06	-	1,60 ± 0,08	-	nd
	NA _{SR}	13,34 ± 0,18	17,60 ± 0,86	17,86 ± 0,31	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	7,70 ± 0,77	7,84 ± 1,50	11,67 ± 0,36	nd	nd
Rutin	CS-NIE	4,95 ± 0,13	-	2,53 ± 0,07	-	nd
	NA _{SR}	2,79 ± 0,53	3,25 ± 0,07	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
ε-Viniferin	NIE _{CS}	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Antocijani (µg/100 mgE)						
Oenin klorid	CS-NIE	47,12 ± 0,25	-	64,71 ± 0,01	-	31,42 ± 2,56
	NA _{SR}	28,57 ± 0,36	50,48 ± 0,35	46,26 ± 0,37	8,62 ± 0,13	7,91 ± 0,18
	NA-GA _{SR}	40,73 ± 3,87	15,23 ± 0,52	15,86 ± 0,26	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	57,80 ± 1,01	44,69 ± 1,96	44,03 ± 1,29	13,53 ± 0,62	12,92 ± 0,21
Mirtilin klorid	CS-NIE	2,29 ± 0,03	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	CS-NIE	0,96 ± 0,04	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	CS-NIE	5,40 ± 0,04	-	6,29 ± 0,21	-	2,41 ± 0,42
	NA _{SR}	2,36 ± 0,21	4,39 ± 0,48	3,53 ± 0,24	nd	nd
	NA-GA _{SR}	3,66 ± 0,34	1,81 ± 0,29	1,60 ± 0,13	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	4,08 ± 0,52	3,17 ± 0,77	2,65 ± 0,26	nd	nd
Kuromanin klorid	CS-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određeni uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (µg/100 mgE) ± SD.

Tablica P3.2 Maseni udio **pojedinačnih fenolnih spojeva** iz neinkapsuliranog **ekstrakta tropa cabernet franc (CF-NIE)** te inkapsuliranog CF ekstrakta sušenjem raspršivanjem pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) **tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave**

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Fenolne kiseline (µg/100 mg _E)						
Galna kiselina	CF-NIE	2,09 ± 0,06	-	1,19 ± 0,17	-	141,38 ± 6,37
	NA _{SR}	nd	1,74 ± 0,10	1,16 ± 0,03	23,87 ± 1,24	47,97 ± 0,52
	NA-GA _{SR}	0,78 ± 0,01	nd	nd	52,46 ± 1,47	23,64 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SR}	3,01 ± 0,06	nd	nd	103,68 ± 0,85	124,35 ± 0,46
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	17,01 ± 0,08
	NA _{SR}	nd	nd	nd	10,69 ± 0,66	16,16 ± 0,88
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	17,81 ± 0,04	17,89 ± 0,68
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	32,13 ± 1,25	35,90 ± 0,91
Vanilinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	4,39 ± 0,00
	NA _{SR}	nd	2,41 ± 0,13	2,09 ± 0,10	1,25 ± 0,16	1,41 ± 0,13
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	2,85 ± 0,19	3,35 ± 0,08
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	3,74 ± 0,06	3,56 ± 0,00

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Siringinska kiselina	CF-NIE	6,92 ± 0,78	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	0,79 ± 0,25	3,06 ± 0,54	1,43 ± 0,16	3,09 ± 0,02
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	3,46 ± 0,30	1,78 ± 0,11
	NA-ŽEL _{SR}	6,60 ± 0,99	nd	nd	nd	nd
Elaginska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	1,28 ± 0,00
	NA _{SR}	nd	0,45 ± 0,07	0,56 ± 0,00	1,24 ± 0,07	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	2,82 ± 0,45	6,39 ± 0,15
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	5,15 ± 0,34	6,87 ± 0,34
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	9,37 ± 0,06
	NA _{SR}	nd	nd	nd	7,16 ± 0,13	12,43 ± 0,58
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	6,84 ± 0,64	3,81 ± 0,34
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	7,57 ± 0,46	10,67 ± 0,34
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	CF-NIE	0,43 ± 0,06	-	0,44 ± 0,00	-	3,93 ± 0,70
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Kafeinska kiselina	CF-NIE _{CF}	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mg_E)						
Epikatehin	CF-NIE	343,19 ± 7,06	-	324,16 ± 4,16	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	28,38 ± 1,17	19,62 ± 0,67
	NA-GA _{SR}	nd	76,58 ± 0,79	49,87 ± 1,40	23,72 ± 2,67	26,83 ± 4,37
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	78,31 ± 0,51	48,23 ± 2,00
Katehin	CF-NIE	100,95 ± 12,01	-	139,84 ± 2,90	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{SR}	3,41 ± 0,21	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	46,33 ± 0,09	24,80 ± 0,57	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	47,62 ± 3,86	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	32,06 ± 0,06
Epikatehin galat	NA _{SR}	nd	2,88 ± 0,46	1,53 ± 0,02	2,24 ± 0,23	1,89 ± 0,09
	NA-GA _{SR}	nd	4,02 ± 0,11	4,25 ± 0,51	4,02 ± 0,04	11,92 ± 1,20
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	7,05 ± 0,74	6,35 ± 0,51
	CF-NIE	nd	-	nd	-	190,83 ± 6,03
Galokatehin galat	NA _{SR}	nd	nd	nd	131,50 ± 0,93	153,00 ± 0,61
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	288,51 ± 4,03	251,35 ± 11,10
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	451,57 ± 5,75	443,02 ± 1,09
	CF-NIE	60,20 ± 0,10	-	72,36 ± 7,13	-	nd
Procijanidin B1	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	111,71 ± 5,15	-	137,25 ± 3,75	-	nd
Procijanidin B2	NA _{SR}	nd	138,25 ± 10,40	124,86 ± 0,68	6,62 ± 0,18	14,04 ± 1,94
	NA-GA _{SR}	nd	20,43 ± 2,05	13,28 ± 1,77	8,30 ± 0,15	12,24 ± 0,15
	NA-ŽEL _{SR}	241,83 ± 5,52	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	19,62 ± 0,67	-	15,89 ± 0,38	-	nd
Kvercetin	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	46,81 ± 0,68	-	64,19 ± 0,00	-	18,86 ± 1,80
Rutin	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
Kempferol	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
Flavonoli (µg/100 mgE)						
Kvercetin	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	19,62 ± 0,67	-	15,89 ± 0,38	-	nd
Rutin	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	46,81 ± 0,68	-	64,19 ± 0,00	-	18,86 ± 1,80
Kempferol	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
ε-Viniferin	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	Antocijani (μg/100 mg_E)					
	CF-NIE	511,54 ± 1,17	-	733,77 ± 1,11	-	259,78 ± 23,24
	NA _{SR}	42,58 ± 0,14	54,90 ± 0,13	45,87 ± 0,44	41,86 ± 2,19	37,16 ± 0,49
Oenin klorid	NA-GA _{SR}	27,56 ± 0,54	275,81 ± 0,23	209,88 ± 0,36	91,08 ± 6,32	26,96 ± 2,60
	NA-ŽEL _{SR}	188,30 ± 0,17	223,21 ± 1,85	201,89 ± 0,11	121,72 ± 8,14	80,89 ± 5,77
Mirtilin klorid	CF-NIE	7,98 ± 0,30	-	6,73 ± 0,01	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	CF-NIE	3,11 ± 0,17	-	3,62 ± 0,22	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3-O-glukozid-klorid	CF-NIE	45,42 ± 0,90	-	61,59 ± 1,32	-	18,64 ± 2,23
	NA _{SR}	2,58 ± 0,10	4,17 ± 0,49	3,18 ± 0,13	2,88 ± 0,30	1,96 ± 0,25
	NA-GA _{SR}	1,35 ± 0,20	20,46 ± 2,05	13,28 ± 0,15	4,87 ± 1,02	nd
	NA-ŽEL _{SR}	14,89 ± 0,30	13,74 ± 0,66	11,92 ± 0,20	8,33 ± 1,54	nd
Kuromanin klorid	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Kalistefin klorid	CF-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „–“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određen uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}_E$) $\pm$ SD.

Tablica P3.3 Maseni udio **pojedinačnih fenolnih spojeva** iz neinkapsuliranog **ekstrakta tropa merlot (M-NIE)** te inkapsuliranog M ekstrakta **sušenjem raspršivanjem** pomoću različitih omotača (NA_{SR}, NA-GA_{SR}, NA-ŽEL_{SR}) **tijekom tri faze *in vitro* simulirane probave**

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
<i>Fenolne kiseline (μg/100 mg_E)</i>						
Galna kiselina	M-NIE	1,57 ± 0,16	-	1,61 ± 0,04	-	98,41 ± 0,59
	NA _{SR}	0,38 ± 0,06	14,91 ± 0,72	18,57 ± 0,03	138,18 ± 2,44	55,88 ± 1,56
	NA-GA _{SR}	0,89 ± 0,13	1,78 ± 0,00	1,42 ± 0,38	207,12 ± 10,68	462,43 ± 15,11
	NA-ŽEL _{SR}	1,60 ± 0,00	3,79 ± 0,09	3,07 ± 0,94	399,78 ± 1,13	454,06 ± 57,52
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	9,33 ± 0,17
	NA _{SR}	nd	14,00 ± 0,06	17,95 ± 0,16	42,00 ± 0,25	50,60 ± 0,93
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	104,40 ± 3,39	119,30 ± 2,01
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	158,34 ± 6,24	179,09 ± 4,34
Vanilinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	2,72 ± 0,08
	NA _{SR}	nd	2,99 ± 0,22	4,56 ± 0,06	3,77 ± 0,06	6,08 ± 0,00
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	9,33 ± 0,88	17,81 ± 0,50
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	15,90 ± 0,19	8,93 ± 0,57
Siringinska kiselina	M-NIE	12,14 ± 2,90	-	11,88 ± 0,13	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	7,80 ± 0,00	3,52 ± 0,12
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	48,79 ± 0,76
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	13,76 ± 0,19	14,54 ± 2,83
Elaginska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	2,52 ± 0,08
	NA _{SR}	nd	nd	nd	5,09 ± 0,19	11,45 ± 0,37
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	5,69 ± 0,75	14,78 ± 1,26
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	8,69 ± 0,94	17,60 ± 3,02
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	5,92 ± 0,06
	NA _{SR}	nd	nd	nd	45,82 ± 0,19	5,55 ± 1,37
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	23,37 ± 0,38	31,25 ± 0,63
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	38,35 ± 3,21	44,54 ± 6,41
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	M-NIE	0,28 ± 0,03	-	0,36 ± 0,03	-	2,16 ± 0,08
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Kafeinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Ferulinska kiselina	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavanoli (µg/100 mgE)						
Epikatehin	M-NIE	190,58 ± 9,18	-	200,57 ± 2,08	-	38,79 ± 0,53
	NA _{SR}	25,46 ± 4,56	16,39 ± 1,25	17,88 ± 2,82	75,58 ± 4,39	nd
	NA-GA _{SR}	nd	44,47 ± 0,44	41,68 ± 6,20	151,67 ± 5,40	132,83 ± 1,76
	NA-ŽEL _{SR}	19,36 ± 2,08	162,90 ± 16,94	220,09 ± 20,08	294,22 ± 11,72	207,49 ± 11,69
Katehin	M-NIE	101,90 ± 6,52	-	98,69 ± 1,03	-	nd
	NA _{SR}	9,41 ± 0,61	20,67 ± 3,29	38,93 ± 2,47	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	85,11 ± 4,99	103,28 ± 4,81	nd	nd
Epikatehin galat	M-NIE	nd	-	nd	-	7,35 ± 0,73
	NA _{SR}	nd	8,88 ± 1,28	11,15 ± 0,25	6,73 ± 0,00	30,47 ± 3,74
	NA-GA _{SR}	nd	5,88 ± 0,63	9,35 ± 0,19	29,77 ± 0,13	38,19 ± 2,14
	NA-ŽEL _{SR}	nd	15,97 ± 1,32	24,54 ± 3,96	36,88 ± 0,76	39,47 ± 5,66
Galokatehin galat	M-NIE	104,18 ± 3,47	-	114,91 ± 2,29	-	178,11 ± 0,17
	NA _{SR}	nd	nd	nd	447,37 ± 22,18	441,97 ± 13,20
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	787,15 ± 8,92	1021,90 ± 7,81
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	1298,22 ± 24,19	1500,06 ± 1,32
Procijanidin B1	M-NIE	28,71 ± 0,46	-	44,79 ± 5,83	-	nd

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
	NA _{SR}	nd	nd	nd	109,03 ± 1,69	95,78 ± 8,91
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	177,08 ± 17,72	235,66 ± 13,98
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	250,13 ± 1,51	268,03 ± 29,42
	M-NIE	58,30 ± 2,27	-	61,28 ± 0,54	-	nd
Procijanidin B2	NA _{SR}	nd	74,85 ± 1,72	148,35 ± 46,00	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	176,46 ± 6,55
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Flavonoli (µg/100 mgE)						
Kvercetin	M-NIE	13,12 ± 0,81	-	5,93 ± 0,31	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Rutin	M-NIE	7,00 ± 1,00	-	8,30 ± 0,01	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Kempferol	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Stilbeni (µg/100 mgE)						
Resveratrol	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
ε-Viniferin	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Antocijani (µg/100 mgE)						
Oenin klorid	M-NIE	26,58 ± 0,64	-	38,08 ± 0,28	-	20,56 ± 1,49
	NA _{SR}	7,84 ± 0,17	12,83 ± 0,16	12,97 ± 1,00	13,02 ± 1,13	4,89 ± 0,06
	NA-GA _{SR}	3,27 ± 0,66	12,73 ± 0,76	14,57 ± 0,69	13,77 ± 0,13	13,18 ± 0,00
	NA-ŽEL _{SR}	22,59 ± 0,42	28,55 ± 0,09	41,21 ± 4,15	18,71 ± 0,76	14,67 ± 1,51

Fenolni spoj	Uzorak	Oralna faza	Želučana faza		Crijevna faza	
		OP ₃	GP ₆₃	GP ₁₂₃	IP ₁₈₃	IP ₂₄₃
Mirtilin klorid	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Petunidin klorid	M-NIE	0,27 ± 0,01	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid-klorid	M-NIE	5,49 ± 0,20	-	7,34 ± 0,13	-	3,04 ± 0,42
	NA _{SR}	0,92 ± 0,08	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	2,72 ± 0,31	1,86 ± 0,25	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	3,67 ± 0,47	5,12 ± 0,28	4,60 ± 1,60	nd	nd
Kuromanin klorid	M-NIE	nd	-	nd	-	nd
	NA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-GA _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd
	NA-ŽEL _{SR}	nd	nd	nd	nd	nd

OP – oralna faza, GP – želučana faza, IP – crijevna faza, nd – spoj nije identificiran, „-“ – spoj nije određen. Brojevi u indeksu kratica označavaju vremenski interval kada je određen uzorak uzet tijekom simulirane probave (npr. GP₆₃ – 63. minuta želučane faze). Za ekstrakt su prikazane krajnje točke oralne, želučane i crijevne faze (OP₃, GP₁₂₃, IP₂₄₃). Maseni udio pojedinačnih fenolnih spojeva prikazan je kao srednja vrijednost (μg/100 mg_E) ± SD.